HAL
open science

Analyse des performances de tests commerciaux pour le dépistage des anticorps au cours de la leishmaniose viscérale méditerranéenne

Émilie Battery

To cite this version:

Émilie Battery. Analyse des performances de tests commerciaux pour le dépistage des anticorps au cours de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. Sciences pharmaceutiques. 2019. dumas-02314945

HAL Id: dumas-02314945

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02314945v1

Submitted on 14 Oct 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

LE 11 OCTOBRE 2019

PAR

Mlle Emilie BATTERY

Née le 8 OCTOBRE 1991 à SCHOELCHER (Martinique)

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

ANALYSE DES PERFORMANCES DE TESTS COMMERCIAUX POUR LE DEPISTAGE DES ANTICORPS AU COURS DE LA LEISHMANIOSE VISCERALE MEDITERRANEENNE

THESE ARTICLE

JURY :

Président : Mme le Professeur Nadine AZAS

Directrice : Mme le Professeur Laurence LACHAUD

Co-directrice : Mme le Docteur Maude LÉVÊQUE

Assesseurs : Mr le Docteur Charles MARY

Mme le Docteur Coralie L'OLLIVIER

Faculté de Pharmacie
Aix-Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Jean-Pierre REYNIER, M. Henri PORTUGAL
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Aurélie BELENGUER
Responsable de la Scolarité :	Mme Nathalie BESNARD

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS	
BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN-JAU Mme Florence SABATIER-MALATERRE Mme Nathalie BARDIN
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	M. Maxime LOYENS

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Fanny MATHIAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHARMACIE CLINIQUE	M. Florian CORREARD
PHARMACOCINETIQUE	Mme Nadège NEANT

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier
Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier
M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire
Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint
M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire
M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie
Mme Clémence TABELE, Pharmacien-Praticien attaché
Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint
M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier
M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 22 février 2018

Remerciements

A Madame le Professeur Nadine AZAS,

Merci de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Madame le Professeur Laurence LACHAUD,

Merci de m'avoir accueillie et formée dans votre service. Merci de m'avoir proposé ce beau travail de thèse. Merci pour votre implication, votre disponibilité, vos précieux conseils et votre attention dans la lecture de cette thèse. Merci d'avoir partagé votre réseau de confrères pour la réalisation de cette thèse. Merci d'avoir su m'orienter dans ce travail. Travailler à vos côtés a été un enrichissement tant sur le plan théorique, pratique qu'humain. Soyez assurée de ma profonde estime et de ma plus haute considération.

A Madame le Docteur Maude LEVÊQUE

Merci pour ton implication, ta disponibilité, et tes précieux conseils pour la réalisation de cette thèse. Merci d'avoir pris le temps de nous former lors de ces six mois de stage, et d'avoir toujours répondu à mes questions. Merci pour ton aide et ton soutien tout au long de ce travail. Soit assurée de ma profonde considération.

A Monsieur le Docteur Charles MARY,

Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Coralie L'OLLIVIER

Merci de me faire l'honneur de participer à ce jury de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Judith FILLAUX

Merci d'avoir amplement participé à l'analyse de toutes ces données recueillies. J'admire la rigueur qui accompagne votre travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon plus profond respect.

A toutes mes rencontres durant l'internat,

Merci à toute l'équipe de parasitologie-mycologie du CHU de Montpellier. Merci pour votre soutien inconditionnel durant ce travail. Un grand merci à Maryline pour ton aide, et tes précieux conseils tout au long de ce travail.

Merci à toute l'équipe de parasitologie-mycologie du CHU de Martinique, de m'avoir accueilli en tant que FFI avant le début de mon internat, ce fut un stage formateur, et qui m'a fait aimer cette discipline. Merci à madame DESBOIS et Charline d'avoir pris le temps de me former et d'avoir toujours répondu à mes questions durant ces 6 mois. Merci aux techniciennes avec qui j'ai bien rigolé durant ces 6 mois, et que j'espère revoir une fois rentrée en Martinique.

Merci à toute l'équipe du laboratoire d'Alès de m'avoir accordé le temps nécessaire pour mener à bien ma thèse. Merci pour votre accueil et votre motivation continuelle.

Merci à mes co-internes pour ces semestres passés ensemble.

Merci à tous ceux que j'ai rencontré.

A mes parents chéris,

Merci pour votre éducation, vos conseils avisés, votre présence et votre amour quotidien. Merci de m'avoir soutenue dans mon choix professionnel, d'avoir été avec moi durant toutes ces années, malgré la distance. Vous serez toujours mes modèles.

A Lauriane,

Ma grande sœur, et presque deuxième maman ! Merci de me soutenir et de me protéger depuis toujours. Merci de me suivre dès qu'il s'agit de faire des bêtises, mais d'être aussi la

voix de la raison quand c'est nécessaire. Merci pour tout ce que nous avons vécu et que nous continuerons de vivre toutes les deux.

A mes cousins,

Merci pour tous ces souvenirs de vacances de folie, en particulier ces fameuses vacances de décembre 2006, et toutes ces dégustations de « fromages ». Merci pour toutes ces sorties avant l'âge requis …

A ma toute famille,

Merci pour tous ces souvenirs de moment en famille, et pour votre soutien à un moment ou un autre de ma vie.

A mes chiquitas de Bordeaux,

Merci pour cette amitié née de notre rencontre en première année. Merci pour cette motivation commune malgré la distance. Merci pour tous ces moments entre filles. Je vous souhaite le meilleur. A bientôt en Martinique.

A tous mes amis, d'enfance, de pharmacie,

Merci pour ce chemin parcouru ensemble.

SOMMAIRE

Introduction

Première partie : Diagnostic biologique de la leishmaniose viscérale à *Leishmania infantum*

1. Diagnostic direct
   1.1. Prélèvements
   1.2. Examen direct
   1.3. Culture
   1.4. Biologie moléculaire
   1.5. Recherche d'antigènes
2. Diagnostic indirect : revue de la littérature, article soumis à Frontiers in Cellular and Infection Microbiology : « Place of serology in the diagnosis of zoonotic *leishmaniases »*

Deuxième partie : Travail Personnel

1. Introduction au travail
2. Article soumis à PLOS Neglected Tropical Diseases : *« Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis »*

Discussion – Conclusion

Annexes : Généralités sur les leishmanioses et focus sur la leishmaniose viscérale

Références bibliographiques

LISTE DES ABREVIATIONS

BOM : Biopsie Ostéo-Médullaire

CNR : Centre National de Référence

CNRL : Centre National de Référence des Leishmanioses

ELISA : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

HAS : Haute Autorité de Santé

ICT : Immuno-Chromatographic Tests

LV : Leishmaniose Viscérale

MGG : May-Grünwald Giemsa

PCR : Polymerase Chain Reaction

WB : Western Blot

Introduction

Les leishmanioses sont des maladies largement répandues dans quatre continents et dues à un protozoaire parasite du genre *Leishmania*. Le parasite est transmis à l'hôte mammifère, dont l'Homme, par piqûre d'un insecte vecteur : le phlébotome. Plusieurs formes cliniques sont observées, cutanées, cutanéo-muqueuses et viscérale. Les leishmanioses humaines sont considérées comme des maladies tropicales négligées bien que leur prévalence mondiale soit proche de 12 millions (OMS, 2019). La leishmaniose viscérale (LV) est un problème de santé publique dans plusieurs pays dont la Tunisie, le Maroc, le Brésil, le Soudan et l'Inde. Elle est due à deux espèces ; *Leishmania infantum* et *Leishmania donovani.* Dans le bassin méditerranéen, la leishmaniose viscérale est due à *Leishmania infantum*. Il s'agit d'une zoonose avec le chien comme principal réservoir du parasite. Chez l'homme la maladie est plus rare, mais mortelle en absence de traitement. En France, l'incidence des LV liées à une contamination autochtone est faible avec 10 à 20 cas par an (données du Centre National de Référence des Leishmanioses) (CNRL, 2019). Elle est beaucoup plus fréquente dans certains pays du Maghreb en particulier au Maroc et en Tunisie avec des incidences de l'ordre de 100 à 150 cas par an (Aoun et al., 2009) (El Alami S.). Cette maladie continue d'affecter largement les enfants de moins de 5 ans dans le pourtour méditerranéen (Aboudourib M.). Un enjeu capital est de poser le diagnostic avec des moyens simples et efficaces. Depuis plus d'une décennie, la PCR est considérée comme la technique de référence avec d'excellentes performances (Antinori et al., 2007). Néanmoins, elle nécessite des équipements spécifiques pas toujours disponibles dans les laboratoires des régions du pourtour de la méditerranée. Par ailleurs, il est important d'y adjoindre systématiquement la recherche d'anticorps anti-*Leishmania* afin d'assurer un meilleur diagnostic biologique (HAS, 2017).

En France, le Centre National de Référence des Leishmanioses (CNRL) a des missions définies par Santé Publique France, dont une est l'expertise diagnostique. Le CNRL participe aussi à la lutte et au contrôle de cette maladie, œuvre à l'amélioration des connaissances dans ce domaine. A ce titre, des travaux d'évaluation des techniques diagnostiques doivent être réalisées. Ce travail avait pour objectif d'évaluer les performances (sensibilité et spécificité) de six trousses commerciales de dépistage des anticorps anti-*Leishmania* : quatre techniques ELISA (enzyme-linked immunosorbent assays) et deux tests de diagnostic rapide immuno-chromatographie (ICT). La technique de western-blot considérée comme la technique de confirmation a aussi été évaluée. Pour cela une cohorte de patients vivant en France, au Maroc

ou en Tunisie et ayant une LV confirmée par une méthode parasitologique a été sélectionnée pour cette l'étude. Un groupe contrôle de patients n'ayant aucun signe clinique de leishmaniose et vivant en zone d'endémie a été testé. Une évaluation médico-économique incluant : le temps de réalisation et la simplicité d'utilisation, a été adjointe.

Au final, dans ce travail de thèse, dans une première partie nous rappelons les principales méthodes du diagnostic biologique de la LV, avec un premier article qui est une revue de la littérature de la sérologie dans la LV méditerranéenne *(« Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases »*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology). Dans la seconde partie, nous présentons notre travail personnel qui fait l'objet d'un deuxième article : *« Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis »*, soumis à PLOS Neglected Tropical Diseases.

PREMIERE PARTIE :

Diagnostic biologique de la leishmaniose viscérale à *Leishmania infantum*

La leishmaniose viscérale (LV) est une maladie mortelle si elle n'est pas traitée. Les signes cliniques de la LV sont non spécifiques et peuvent ressembler à ceux d'autres maladies (infectieuses ou non). De plus, les traitements spécifiques sont toxiques et/ou couteux. Le diagnostic biologique de certitude est donc indispensable. Actuellement, le diagnostic repose sur la combinaison de plusieurs techniques : examen direct, culture et PCR réalisés sur des échantillons sanguins ou de moelle osseuse, exceptionnellement sur d'autres échantillons tissulaires (biopsie intestinale, lavage bronchiolo-alvéolaire…).

Nous présentons ci-dessous la valeur diagnostique des différentes méthodes et une revue de la littérature a été menée sur la valeur des techniques sérologiques et la place de la sérologie pour le diagnostic de la LV méditerranéenne.

1 Diagnostic biologique direct

1.1 Les Prélèvements

Dans la leishmaniose viscérale, c'est la ponction de **moelle osseuse** ou la biopsie ostéo-médullaire qui est le plus souvent utilisée. En plus de confirmer le diagnostic, le myélogramme (ou BOM) permet de réfuter les principaux diagnostics différentiels en particulier les hémopathies malignes.

La recherche de parasite sur **sang total** ou, mieux, la couche leucocytaire (la leuco-cytocentrifugation augmentant la sensibilité) (Izri et al., 1996), est privilégiée, en raison du caractère peu invasif du prélèvement.

Selon le contexte clinique, la recherche de leishmanies peut aussi s'effectuer sur des prélèvements de foie, de ganglions lymphatiques, de muqueuse digestive ou de liquide de lavage bronchiolo-alvéolaire. La ponction d'une rate fragilisée est dangereuse, et n'est pas pratiquée en France.

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite (examen direct ou culture), des antigènes, ou de son ADN (biologie moléculaire).

1.2 Examen direct

L'examen direct, est classiquement réalisé sur frottis de sang ou de moelle osseuse, après coloration au MGG (May-Grünwald-Giemsa). Il permet d'observer les formes **amastigotes**, en général intracellulaires à l'intérieur de monocytes, ou également extracellulaires. Cette technique simple (peut être pratiquée partout), rapide, et peu coûteuse requiert tout de même

un examinateur expérimenté et un examen long et minutieux, la densité de parasite pouvant être très faible. La sensibilité de cette technique reste modeste, entre 30 à 80%.

1.3 Culture

Réservée aux laboratoires spécialisés, la culture sur gélose au sang de lapin : milieu NNN (Novy, McNeal, Nicolle) ou un équivalent (milieu de Schneider) est incubé entre 24 et 28 °C. La culture est lente et peut nécessiter trois à cinq semaines avant de conclure à une négativité.
Le parasite est, en culture, sous forme **promastigote** flagellée et mobile, comme chez le vecteur.
Cette technique présente un coût élevé et la sensibilité est d'environ 60 à 80 %.

1.4 Biologie moléculaire

En France et dans les pays développés, le diagnostic moléculaire utilisé depuis une vingtaine d'années, est aujourd'hui devenu la méthode de référence pour le diagnostic des leishmanioses. Cependant, peu de kits commerciaux sont disponibles, et aucun n'a été correctement évalué par rapport à des méthodes de référence fiables. En conséquence, la plupart des laboratoires continuent à réaliser ce diagnostic avec des méthodes de PCR dites "maison". Les gènes cibles utilisés sont ceux de **l'ADN kinétoplastique** ou ceux codant pour les **ARN ribosomaux.**
La biologie moléculaire offre l'avantage d'une très grande sensibilité et spécificité, et d'une rapidité de résultat par rapport à la culture (Cruz et al., 2006). De plus, elle permet de détecter l'ADN parasitaire dans des échantillons ou des cultures contaminées par des bactéries ou des champignons, et de réaliser, sur le même échantillon, une identification de l'espèce de *Leishmania* en cause. Cette technique nécessite néanmoins un équipement particulier par toujours disponible dans les laboratoires des pays en voie de développement.
Dans la leishmaniose viscérale, aussi bien à *L. infantum* qu'à *L. donovani*, la PCR réalisée sur du sang périphérique s'est révélée avoir une sensibilité très proche de 100 %, ce qui évite la ponction médullaire et représente une méthode peu invasive, particulièrement appréciable dans le suivi des patients immunodéprimés et comme marqueur précoce de rechute (Bourgeois et al., 2010) (Lachaud et al., 2000) (Maurya et al., 2005).
L'existence d'une cible ADN extrêmement répétée (kinétoplastique) a permis la mise au point d'une méthode ultrasensible permettant, en particulier chez les sujets immunodéprimés, d'une part, la détection du portage asymptomatique, d'autre part, la définition d'un seuil

parasitémique au-dessus duquel les symptômes peuvent apparaître au moment des rechutes (Bourgeois et al., 2008) (Mary et al., 2006).

1.5 Recherche d'antigènes

La recherche d'antigènes de leishmanies a aussi été développée, notamment pour améliorer le diagnostic chez les immunodéprimés. Cependant dans le sérum des facteurs immunologiques peuvent couvrir les déterminants antigéniques importants ou inhiber de manière compétitive la liaison des anticorps à l'antigène libre (Cruz et al., 2006). Ainsi, plusieurs méthodes de détection d'antigènes circulants dans les urines ont été mis au point, notamment le test d'agglutination au latex (KAtex®), qui est un test simple, rapide, non invasif, et peu couteux, avantageux dans les zones où les moyens médicaux sont limités. Le KAtex® détecte un antigène glucoconjugué, thermostable, de faible poids moléculaire (5 à 20 kD), présent à la fois dans les formes promastigotes et amastigotes du parasite. Cette méthode pourrait convenir au primo-diagnostic de la LV, au suivi de l'efficacité du traitement et à la détection des infections infracliniques (Riera et al., 2004). La spécificité est élevée de 82 à 100% et la sensibilité varie de 47 à 95%. Pour les patients immunodéprimés, la sensibilité et la spécificité sont respectivement de 85–100% et 96–100% (Cruz et al., 2006). Cependant l'évaluation a portée essentiellement sur la LV à *L. donovani* et cette méthode n'est pas commercialisée en France.

2 Diagnostic biologique indirect

Une revue de la littérature est présentée dans l'article qui suit sur les techniques sérologiques pour le diagnostic de la LV méditerranéenne.

« Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases »

Article soumis à Frontiers in Cellular and Infection Microbiology le 02/09/2019.

« Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases »

Article soumis à Frontiers in Cellular and Infection Microbiology le 02/09/2019.

Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases

Maude Leveque[1, 2], Laurence Lachaud[1, 2], Loïc Simon[3, 4], Emilie Battery[1, 2], Pierre Marty[3, 4], CHRISTELLE POMARES[4, 3*]

[1]Département de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, France, [2]UMR MIVEGEC, Centre National de Référence des Leishmanioses, France, [3]Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU Nice, France, [4]INSERM U1065 Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, France

Submitted to Journal:
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Specialty Section:
Clinical Microbiology

Article type:
Review Article

Manuscript ID:
495409

Received on:
02 Sep 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

In review

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest

Author contribution statement

LL, ML, PM, CP drafted the work. LS revised it critically for important intellectual content;
LL, ML, PM, CP Provide approval for publication of the content;
LL, M, PM and CP contributed conception and design of the study; ML realized the figure; EB and LS wrote sections of the manuscript. All authors contributed to manuscript revision, read and approved the submitted version.

Keywords

Visceral leishmaniasis, Tegumentary leishmaniasis, zoonosis, Serology, diagnosis

In review

Abstract

Word count: 209

Leishmaniases are a group of parasitic diseases transmitted through the bite of female phlebotomine sandflies. Depending on the Leishmania species, the reservoirs can be humans (anthroponosis) or different animals (zoonosis). Zoonotic leishmaniasis present several clinical forms in function of the species involved: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and muco-cutaneous leishmaniasis (MCL). The biological diagnosis is of utmost importance because the clinical features are not specific. In addition to parasitological and molecular biology (polymerase chain reaction, PCR) assays, serology is routinely used for the diagnosis of leishmaniasis. Indeed, although PCR is more sensitive than serological assays, its implementation is limited to referral laboratories and research centers. Therefore, serology is still a key element for their diagnosis. Here, we discuss the different serological assays available for the diagnosis of zoonotic leishmaniasis. We will review the enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence antibody test, immunochromatography test (ICT), direct agglutination test, and western blot and the different diagnostic strategies in function of the clinical form (VL, CL, and MCL). We will also discuss the place of serology for detecting asymptomatic carriers and for the follow-up of VL. Depending on the laboratory, different assays can be used, from ICT, which is appropriate for field testing, to a combination of serological tests to improve the sensitivity.

Contribution to the field

Dear Editor Please find the first submission of the article entitled: “Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases” This review corresponds to an analysis of the publication on the following topic: The serology for the diagnosis of zoonotic leishmaniases In this review, we discuss the different serological assays available for the diagnosis of zoonotic leishmaniasis. We review the enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence antibody test, immunochromatography test (ICT), direct agglutination test, and western blot and the different diagnostic strategies in function of the clinical form (VL, CL, and MCL). We will also discuss the place of serology for detecting asymptomatic carriers and for the follow-up of VL. The manuscript has not been submitted or accepted elsewhere All the authors fulfill the criteria for the authorship No writing assistance other than copy editing was provided in the preparation of the manuscript. All authors have seen and approved the content and have contributed significantly to the work. I hope you will appreciate this article. Yours sincerely The authors

Funding statement

No funding sources have been used for this review.

Place of serology in the diagnosis of zoonotic leishmaniases

Maude Leveque[1], Laurence Lachaud[1], Loïc Simon[2], Emilie Battery[1], Pierre Marty[2], Christelle Pomares[2, *]

[1] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire et Université de Montpellier, UMR MIVEGEC, Centre National de Référence des Leishmanioses, Montpellier France.

[2] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire l'Archet, INSERM, U1065, C3M, Virulence microbienne et signalisation inflammatoire - Université de la Côte d'Azur, Faculté de Médecine, Laboratoire associé au Centre National de Référence des Leishmanioses, Nice, France.

Corresponding author: Christelle Pomares; pomares.c@chu-nice.fr

Key words: visceral leishmaniasis, tegumentary leishmaniasis, zoonosis, serology, diagnosis

Abstract:
Leishmaniases are a group of parasitic diseases transmitted through the bite of female phlebotomine sandflies. Depending on the *Leishmania* species, the reservoirs can be humans (anthroponosis) or different animals (zoonosis). Zoonotic leishmaniasis present several clinical forms in function of the species involved: visceral leishmaniasis (VL), cutaneous leishmaniasis (CL) and muco-cutaneous leishmaniasis (MCL). The biological diagnosis is of utmost importance because the clinical features are not specific. In addition to parasitological and molecular biology (polymerase chain reaction, PCR) assays, serology is routinely used for the diagnosis of leishmaniasis. Indeed, although PCR is more sensitive than serological assays, its implementation is limited to referral laboratories and research centers. Therefore, serology is still a key element for their diagnosis. Here, we discuss the different serological assays available for the diagnosis of zoonotic leishmaniasis. We will review the enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence antibody test, immunochromatography test (ICT), direct agglutination test, and western blot and the different diagnostic strategies in function of the clinical form (VL, CL, and MCL). We will also discuss the place of serology for detecting asymptomatic carriers and for the follow-up of VL. Depending on the laboratory, different assays can be used, from ICT, which is appropriate for field testing, to a combination of serological tests to improve the sensitivity.

Running title: Serology for zoonotic leishmaniasis

1. Introduction

Leishmaniases are disease caused by *Leishmania* parasites transmitted through the bite of female phlebotomine sandflies. The disease spectrum ranges from a visceral form to localized skin lesions and, occasionally mucosal lesions. The clinical manifestations depend in part on the involved *Leishmania* species. More than 20 species have been identified, and many of them cause zoonoses (Akhoundi et al., 2016). Humans become accidentally infected when they enter an endemic area. *Leishmania major*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum* are the main zoonotic species detected in infected humans. *L. major* is responsible of Old World cutaneous leishmaniasis (CL) that occurs preferentially in rural desert areas where rodents are endemic. *L. guyanensis* and *L.*

braziliensis are agents of CL and mucosal leishmaniasis in the New World, where the reservoirs are forest animals. *L. infantum* is essentially responsible of a domestic zoonosis that involves dogs and is present in foci in the Mediterranean region and in South America. In dogs, the disease presents a generalized cutaneous and an ovarian form that are spontaneously fatal. However, many cases are asymptomatic (Lachaud et al., 2002). It should be noted that the Iberian hare (*Lepus granatensis*) and a wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) have recently been implicated as reservoirs of visceral leishmaniasis (VL) caused by *L. infantum* in Spain (Díaz-Sáez et al., 2014; Molina et al., 2012). In humans, the disease is mainly visceral (VL). *L. infantum* is also responsible of rare forms, such as muco-cutaneous leishmaniasis (MCL) and the lymph node form that are considered close (or related) to VL and are similarly managed. CL due to *L. infantum* is infrequent and can go unnoticed and heal spontaneously.

Currently, several specific techniques are available for the diagnosis of VL and tegumentary leishmaniasis (TL: CL and MCL). The direct diagnosis is considered the gold standard for VL and TL, whatever the species involved. It is based on the direct microscopic examination of colored smears, culture, and PCR analysis of any available sample: whole blood, bone marrow, spleen biopsy, liver biopsy and lymph nodes (for VL), skin (for CL), and mucosal samples (for MCL). Molecular methods (PCR) display the best sensibility and specificity, but their implementation requires specific material and well-equipped laboratories (de Ruiter et al., 2014). Therefore, indirect diagnosis based on serology has been an alternative strategy for many decades, and still remains widely used due to its ease of implementation using serum or plasma samples. Various serological methods are available: immunofluorescence antibody test, enzyme-linked immunosorbent assay, immunochromatography test, direct agglutination test, western blot, and latex agglutination test (reviewed in (Asfaram et al., 2018)). Other assays are also under development with promising results for some of them (Celeste et al., 2014; Maalej et al., 2003; Portela et al., 2018).

In this review article we will critically describe the most frequently used serological assays for the diagnosis of VL due to *L. infantum*, and their interest for CL and MCL. To this aim we identified articles in English language in several databases, including PubMed, Science Direct, Google Scholar and Web of Science, using a combination of terms (serology, *Leishmania*, direct agglutination test, ELISA, western blot, diagnosis, immunofluorescence antibody test, immunochromatic test, visceral leishmaniasis, cutaneous leishmaniasis, muco-cutaneous leishmaniasis, and tegumentary leishmaniasis). We identified other articles by reviewing the reference list of the retrieved articles. For each method, we will present the most relevant assays, and discuss the interest of the different techniques in function of the clinical presentation and available laboratory equipment.

2. Serological diagnosis of visceral leishmaniasis due to *L. infantum*

In humans, VL is characterized by irregular fever, weight loss, enlargement of spleen and liver, and anemia. However, VL may have a broad clinical spectrum, ranging from sub-clinical to the complete clinical form. As symptoms are not specific, VL diagnosis can be challenging. This is an issue because early diagnosis is required for rapid management. Indeed, if left untreated, VL is fatal in more than 95% of cases. In endemic areas, physicians are aware of this disease. On the other hand, in non-endemic areas, it is important that physicians know about this disease (Stensvold et al., 2019) to prescribe the right assay(s) when suspecting VL. As serological assays are widely used in VL endemic areas, in addition to the assessment of their technical performance, we will also evaluate their value for the follow-up of treated patients, in immunocompromised patients, and in asymptomatic carriers.

2.1 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

ELISA is a commonly used method for VL serological screenings. For this test, the well bottoms are coated with the antigen(s) of interest, and then the reaction between the antibodies contained in the patient serum and the antigens is quantified using enzyme-labeled anti-human immunoglobulins. This is an old assay that has been widely used for diagnostic purposes since its first description (Engvall and Perlmann, 1972). For VL, several ELISA assays based on different antigens have been developed. Diagnostic commercial kits and home-made tests are available as well as methods used only for research with the aim of developing new tests to improve VL diagnosis. The sensitivity and specificity of the different tests are influenced by the type of antigen used. Crude soluble antigens (CSA), recombinant proteins and synthetic peptides have been assessed in different settings, yielding heterogeneous results (Figure 1). Evaluation of the commercial assays *Leishmania* ELISA IgG+IgM (Vircell SL, Granada, Spain), Ridascreen *Leishmania* Ab (R-Biopharm AG, Germany), NovaLisa *Leishmania infantum* IgG (Novatec Immundiagnostica GMBH ELISA Germany) and Bordier Kit (Bordier Affinity Products SA, Switzerland) (Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019) showed that sensitivity and specificity range from 63.2% to 78.9% and from 60% to 97.4%, respectively, in patient populations without HIV (Figure 1). In most of these commercial assays, the used antigen is derived from cultures of *L. infantum* promastigotes. In home-made assays, antigens are either CSAs, or the recombinant *Leishmania* K39 protein (rK39) (Deniau et al., 2003; Elmahallawy et al., 2014; Portela et al., 2018). CSA lysates are generally obtained by repeated freezing and thawing of live promastigotes grown in culture followed by cold centrifugation. The sensitivity and specificity of ELISA performed with *L. infantum* CSA range from 40% to 96.7% and from 63% to 100%, respectively (Carvalho et al., 2018; Dias et al., 2018a; Duarte et al., 2017; Magalhães et al., 2017; Portela et al., 2018). CSAs isolated from other *Leishmania* species (i.e., *L. major* or *L. braziliensis*) generally display lower performance (sensitivity between 1% and 87.5%; specificity from 21.3% to 100%) (Celeste et al., 2014; Dias et al., 2018b; Menezes-Souza et al., 2015; Ribeiro et al., 2018). This sensitivity variation could result from antigenic differences among endemic isolates and cultured parasites, while specificity may depend on cross-reactivity with other endemic pathogens. The performance of these tests is also influenced by the preparation quality, and the antigen purity and stability (immunogenic properties may decrease over time). On the other hand, assays based on the rK39 protein, which is also used for home-made ELISA, give more standardized results. On the basis of the information included in some of the retrieved articles, rK39 was mainly purchased from S.G. Reed, Corixa Inc. (Seattle, USA) (Deniau et al., 2003; Lakhal et al., 2012; Maalej et al., 2003) InBios International (Seattle, USA) (De Almeida Silva et al., 2006), and Rekom Biotech (Granada, Spain) (Magalhães et al., 2017). Although heterogeneous results have been reported using ELISA based on this recombinant antigen in patient populations with and without (i.e., immunocompetent) HIV (Deniau et al., 2003; Elmahallawy et al., 2014), a meta-analysis indicated that in patients without HIV, rK39-based ELISA shows better performance than CSA-based ELISA (Maia et al., 2012).

In research, *Leishmania* histone extracts, synthetic peptides and various recombinant proteins that are conserved in different *Leishmania* species but show low similarity with other parasite or hosts proteins have been evaluated. ELISA using *Leishmania* histone extracts displays higher sensitivity (97.6%) and specificity (100%) than *L. infantum* CSA-based ELISA (Lakhal et al., 2012). Synthetic peptides and recombinant proteins offer the possibility of more standardized and uniform production of antigens that can improve test reproducibility. Newly tested recombinant antigens with sensitivity and specificity values higher than 95%, include histone H2A and H2B, gene B protein (rGBP), prohibin (rPHB), enolase, histamine-releasing factor (rHRF), hypothetical proteins (rLiHyD, rLiHyT, rLiHyS, rLiHyE),

homologue receptor for activated C kinase (rLACK), and heat shock protein 83 (rHsp83) (Celeste et al., 2014; Dias et al., 2018a, 2018b; Duarte et al., 2017; Maalej et al., 2003; Portela et al., 2018; Ribeiro et al., 2018). Of note, rHRF, rLiHyD and rLiHyT might be suitable for the serological monitoring of patients with VL after treatment (Portela et al., 2018). Synthesized peptides are potentially more stable, cheaper and easier to produce than recombinant proteins. Some peptides performed well for the diagnosis of VL and displayed little cross-reactivity with sera from patients infected by other parasitic pathogens (Carvalho et al., 2018; Costa et al., 2017; Menezes-Souza et al., 2015). This large panel of molecules, used either alone or in combination, may offer promising alternatives to improve the serodiagnosis of VL by ELISA. However, additional large-scale studies are needed to standardize the experimental conditions for accurate comparisons in different settings.

2.2 Immunofluorescence Antibody Test (IFAT)

IFAT slides are prepared by fixing *Leishmania* promastigotes on glass slides. Then, the serum of interest is serially diluted to obtain quantitative results. Revelation is done using an anti-human immunoglobulin labelled with a fluorescent dye as secondary antibody. The results correspond to a titer (i.e., the last serum dilution yielding a fluorescence signal) evaluated by microscopic examination. Therefore, to perform this assay, the laboratory must have a fluorescent microscope and personnel trained in slide reading (Millesimo et al., 1996). IFAT has been widely used for the diagnosis of VL since the 1970s. Commercial assays and home-made methods are available. In home-made methods, *L. infantum* is the most frequently used species, whereas the use of *Leishmania amazonensis* is rare (De Almeida Silva et al., 2006; Mikaeili et al., 2007; Pedras et al., 2008; Silva et al., 2005). Studies are available for the following IFAT commercial assays: IFI Leishmaniose Humana (Fundação Oswaldo Cruz), *Leishmania* IFA IgG (Vircell), IFI – Leishmaniose Humana (Bio-Manguinhos), and Leishmania-Spot IF (bioMérieux) (Cota et al., 2013; Freire et al., 2019; Krepis et al., 2018; Ntais et al., 2013; Peruhype-Magalhães et al., 2012; Varani et al., 2017). Freire et al compared IFI – Leishmaniose Humana and *Leishmania* IFA IgG and found that the latter displayed higher specificity in patients without HIV infection (Freire et al., 2019). As observed for the ELISA tests, IFAT sensitivity is lower in HIV-positive patients than in non-immunocompromised patients (Bangert et al., 2018; Freire et al., 2019). Sensitivity and specificity for VL diagnosis range from 78.8% to 100% and from 82.3% to 96.2%, respectively, in HIV-negative patients (Freire et al., 2019; Krepis et al., 2018), and from 51% to 78.4% and from 79% to 99.2%, respectively, in HIV-positive patients (Bangert et al., 2018; Cota et al., 2012). Cross-reactivity with Chagas disease, tuberculosis, toxoplasmosis, malaria, typhoid fever, or brucellosis may lead to false-positive results (Bangert et al., 2018; Sakkas et al., 2016; Sarkari et al., 2014). Due to the many protocols used for IFAT and the absence of international standards, it is difficult to compare data from different studies. Indeed, the positivity threshold may hugely vary (1/40 in some studies, 1/80 in others) in function of the studied population and the assay set-up (Bangert et al., 2018; Maia et al., 2012). Finally, IFAT has been used not only for the diagnosis of VL, but also for the detection of asymptomatic carriers of CL and MCL (Sarkari et al., 2014).

2.3 Direct agglutination test (DAT)

DATs have been used for the diagnosis of VL for more than 30 years and are still widely implemented in South America, Iran and to a lesser extent in Europe (Bangert et al., 2018; de Korte et al., 1990; Farahmand and Nahrevanian, 2016; Farajnia et al., 2008; Kühne and Büscher, 2019; Mikaeili et al., 2007; Nigro et al., 1996; Sarkari et al., 2018). The principle of

In review

this assay is to test whether agglutination occurs when serial dilutions of patient serum are mixed with stained killed *Leishmania sp*. promastigotes. This is a semi-quantitative assay, and the results correspond to a titer (Chappuis et al., 2006; Freire et al., 2019). The assay can be set up using *Leishmania donovani* provided by KIT Biomedical Research (Amsterdam, The Netherlands) (Bangert et al., 2018; Pedras et al., 2008) and home-made processed, or freeze-dried *L. infantum* promastigotes available from the Prince Leopold Institute (Antwerp, Belgium) and The Royal Tropical Institute (Amsterdam, The Netherlands) (Oliveira et al., 2011; Pedras et al., 2008). DAT results seem not to be influenced by the used species (*L. donovani* or *L. infantum*) (Pedras et al., 2008). The assay preparation requires culturing live parasites as antigens, and difficulties in the standardization of this step may lead to variation in the test results (Maia et al., 2012). Moreover, 2-mercaptoethanol (2-ME) is needed for the test. As this compound has health and environmental impacts, a new assay has been set up with N-acetylcysteine instead of 2-ME as sample diluent to improve its biosafety (Oliveira et al., 2011). In addition, a new DAT protocol (DAT-LPC) has been published with shorter incubation time (4 hours compared with 18 hours of the DAT KIT from the Royal Tropical Institute of Amsterdam) (Ntais et al., 2013; Oliveira et al., 2009, 2017). The last step is the reading of the end-titer. The end-titer depends on the used protocol, and varies from ≥1/100 for DAT-LPC, 1/1600 for the DAT from KIT-Biomedical Research, to 1/3200 (Adams et al., 2012; Bangert et al., 2018; Kühne and Büscher, 2019; Oliveira et al., 2013; Pedras et al., 2008). However, these variations do not seem to influence the test sensitivity and specificity for the clinical diagnosis of VL (Chappuis et al., 2006). In Brazil, a multicenter study reported good inter-laboratory reproducibility, but highlighted some inter-operators' variations concerning the end-titer reading, especially for low titers (Adams et al., 2012; Oliveira et al., 2017). DAT result interpretation could be standardized by using photographs of training plates validated by reference laboratories (Adams et al., 2012; Oliveira et al., 2017). As this assay can be performed with limited equipment, it is suitable for first-line laboratories (Adams et al., 2012; Pedras et al., 2008; World Health Organization, 2010a). In addition, this assay has good sensitivity and specificity in non-immunocompromised patients (sensitivity: 70.5% - 99% and specificity: 89.2% - 100%) and also in HIV-positive patients (sensitivity: 89.1% - 91.3% and specificity: 89.3% - 89.7%) (Bangert et al., 2018; Cota et al., 2013; Freire et al., 2019; Mikaeili et al., 2007; Oliveira et al., 2013). False-positive results were observed in patients infected by malaria or other parasites, such as trypanosomatids (Bangert et al., 2018; Maia et al., 2012). Thus, this assay can be used for the diagnosis of VL and seroprevalence studies with acceptable costs and good sensitivity and specificity in populations with and without HIV (Bangert et al., 2018).

2.4 Immunochromatic tests (ICT)

Antigen-based ICTs are the most adapted for field testing (World Health Organization, 2010a). These assays are easy to perform, quick and user-friendly, thus allowing their use in remote areas where access to health facilities can be challenging (Elmahallawy et al., 2014; World Health Organization, 2010a). The test consists in a nitrocellulose membrane pre-coated with the rK39 antigen (few tests were developed with rKE16) (World Health Organization, 2010b). A drop of finger-prick blood or of whole blood, plasma or serum from venipuncture can be used. The results are qualitative, and the assay is considered positive when two bands are observed: the control band and the positive test band. Since the end of the 1990s, several brands and versions of the assay have been commercialized and used in endemic areas (Chappuis et al., 2006). WHO evaluated some of the commercially available tests: DiaMed-IT LEISH (Bio-Rad Laboratories), Crystal®KA (Span Diagnostics Ltd.), Signal®-KAb (Span Diagnostics Ltd.), Kalazar Detect™ (InBios International Inc.), and Onsite Leishmania Ab

In review

Rapid Test (CTK Biotech Inc.). Other tests are also on the market: IT LEISH (Bio-Rad Laboratories), rK39-ICT (SD BIOLINE Leishmania Ab, Standard Diagnostics, Inc., South Korea), and Rapydtest (Diagnostic International Distribution S.p.A, Milan, Italy) (Assis et al., 2019; Bangert et al., 2018; Brandonisio et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Cota et al., 2013; Freire et al., 2019; Varani et al., 2017; World Health Organization, 2010b). ICTs have been tested mainly for the diagnosis of anthroponotic leishmaniasis and less frequently for zoonotic leishmaniasis (Boelaert et al., 2014). Overall, ICT diagnostic performance was excellent in the Indian sub-continent compared with East Africa and Brazil where results were less consistent (World Health Organization, 2010b). A study in Brazil assessed cost-effective strategies, and found that VL diagnosis by ICT followed by treatment with amphotericin B (liposomal formulation) is less expensive with high effectiveness (Assis et al., 2019). During outbreaks, this assay is very convenient at the point of care facilities for rapid identification of cases (Bangert et al., 2018). When evaluated for zoonotic VL, this assay has a good specificity, up to 100% in some studies; however, a negative result does not rule out the diagnosis of VL because sensitivity can be lower than 60%, especially in HIV-infected patients (Carvalho et al., 2003; Cota et al., 2013; Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019). Therefore, some authors recommend not to use ICT as a screening test for VL, especially in HIV-positive patients (Cota et al., 2013; Varani et al., 2017). Performances may also vary according the patient age, with lower accuracy in children younger than 3 years (Cruz et al., 2006; Freire et al., 2019). Cross-reactivity with malaria, enteric fever, disseminated tuberculosis, sepsis, infective endocarditis, lymphoma, hepatic insufficiency, and *Toxoplasma gondii* has been reported (Farahmand and Nahrevanian, 2016; Freire et al., 2019). Finally, users should be aware that ICT can be positive in asymptomatic carriers and for long time after treatment. Therefore, these assays cannot discriminate between VL relapse and other pathologies, like all the other serological assays (Elmahallawy et al., 2014).

2.5 Western blot (WB)

By the end of the 1980s, WB assays with potential diagnostic value had been developed for the diagnosis of human VL (dos Santos et al., 1987; Evans et al., 1989). In 1992, Mary et al. developed and evaluated a new WB test in 137 patients in the south of France. They demonstrated that the 14 kDa and 16 kDa antigens were the most specific, with a sensitivity and specificity of 100% and 98%, respectively (Mary et al., 1992). The test was then marketed (LEISHMANIA WB IgG, LDBIO Diagnostics, France), and is currently used as a VL confirmation technique in France (Haute Autorité de Santé, 2017). Other studies in patients with VL due to *L. infantum* also highlighted the excellent results of this test that targets different antigenic fractions (Heidari et al., 2019; Marty et al., 1995; Pinedo-Cancino et al., 2013; Santos-Gomes et al., 2000; Seyyedtabaei et al., 2017; Tebourski et al., 1994). In the immunocompetent patients included in these studies, sensitivity (90% to 100%) and specificity (98% to 100%) were excellent. Nevertheless, the heterogeneity of antigen preparations as well as the choice of reference strain and specific bands do not allows comparing the results of the different studies. Moreover, the number of patients included in studies to evaluate these techniques was often too small (<30 patients) to obtain reliable statistical data. This technique has been evaluated also in immunocompromised patients, particularly patients with HIV, and for the detection of asymptomatic carriers in epidemiological studies (see below). However, this method is too complex to be used for field surveys, or if the daily demand is too important. Indeed, it is time-consuming, not automated, and quite expensive. Currently, it seems important to define which antigenic fractions are most relevant for this test and to assess their value for the diagnosis of VL and possibly for the therapeutic follow-up.

In review

3. Diagnosis of VL in immunocompromised patients.

In immunocompromised patients, antibody-based tests often fail to diagnose VL. Thus, the choice of technique and the knowledge of its limits are essential. In these patients, the sensitivity of IFAT, ICT, DAT and ELISA is generally low (from 22% to 89%) (Bangert et al., 2018; Cota et al., 2012, 2013; Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019). Probably the most robust test in this context is WB (75% to 91% of sensitivity) (Cota et al., 2012). Mary et al found the same WB profile in *Leishmania*-infected patients with HIV and in immunocompetent patients, but for the 14-kD band (not or rarely recognized). Only 36% of these co-infected patients had positive results by IFAT and ELISA (Mary et al., 1992). Deniau et al reported that 74% of patients co-infected by HIV and *Leishmania* have a 'complete' WB profile (18-, 21-, 23-, and 31-kD bands), the profile described by Marty et al as a good marker of symptomatic VL due to *L. infantum* (Deniau et al., 2003; Marty et al., 1995).

4. Asymptomatic carriers.

In endemic areas, asymptomatic carriers represent about percentage of people infected by *Leishmania*. The Leishmanin skin test remains remarkable for assessing endemicity levels, but its implementation is hardly feasible currently (Bekele et al., 2018). Serology is an alternative, if WB is used, because it is the most efficient. In several studies, WB allowed the detection of asymptomatic patients whose frequency varies depending on the context (Biglino et al., 2010; Deniau et al., 2003; Mary et al., 1992; Riera et al., 2008; Saghrouni et al., 2012; Sakru et al., 2007). For instance, 3.1% of blood donors are carriers of anti-*Leishmania* antibodies (Riera et al., 2008), and 54% of family members of patients with VL in Tunisia are positive (Riera et al., 2008; Saghrouni et al., 2012). In a larger study (526 healthy adults) in Italy, 7.41% had a positive WB test (Biglino et al., 2010).

5. Follow-up of treated patients

After VL diagnosis and treatment initiation, a clinical and biological follow-up should be performed to monitor the response to treatment. Serological follow-up (any serological test) is not recommended because antibodies may persist for life after an episode of VL. For instance, Carvalho et al. found that in up to 46% of patients, antibodies can be detected with an ICT assay for months after VL is cured (Carvalho et al., 2003). Therefore, qualitative assays, such as WB and ICT that do not give titers, have limited use for patient follow-up. In addition, WB high sensitivity is suitable for the screening of asymptomatic carriers, but not for VL follow-up. Similarly, ICT can give positive results in asymptomatic patients, and this makes the diagnosis of relapse or re-infection challenging, especially in endemic areas (Brandonisio et al., 2002; Carvalho et al., 2003; Elmahallawy et al., 2014; Maia et al., 2012). Quantitative serological assays (ELISA, IFAT and DAT) also are not recommended for patient follow-up because of the slow decrease of the antibody titer after VL treatment (De Almeida Silva et al., 2006; Ferrua et al., 2009). It should be noted that the slow antibody reduction is not a sign of bad prognosis or poor therapeutic response (De Almeida Silva et al., 2006).
Leishmania DNA detection by quantitative PCR (qPCR) appears to be the reference method for monitoring the response to treatment and for detecting VL relapse or re-infection. The parasite DNA level measured by qPCR should progressively decrease and become undetectable after treatment initiation. The major drawbacks of this assay are the need of trained personnel, and of equipped facilities with separate rooms for DNA extraction,

In review

preparation of the reaction mix, and PCR automat to avoid contamination. Moreover, it is expensive. Therefore, qPCR use is still limited, although it is progressively increasing.

6. Comparison of assays

Comparison of studies on the different serological assays highlights a huge variability in the conclusions. Indeed, the assay performances can changes depending on the population (children, HIV-positive patients, immunocompetent patients) (Bangert et al., 2018; Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019; Krepis et al., 2018). Few studies compared WB with the other serological assays because WB is mainly used for epidemiological studies to detect asymptomatic carriers and less frequently in HIV-infected patients and for CL or MCL diagnosis (Carvalho et al., 2003; Cota et al., 2012; Deniau et al., 2003; Krepis et al., 2018; Maia et al., 2012; Pomares et al., 2012). For the other assays (DAT, ELISA, IFAT and ICT), in addition to the specific limitation of each assay, HIV infection can influence the performance of some tests (ELISA, IFAT) more than others (western blot) (Deniau et al., 2003). Moreover, the impact of the geographic region on the test diagnostic accuracy cannot be excluded, as highlighted by the WHO evaluation of ICT (World Health Organization, 2010b). The type of control population and the chosen threshold also may influence the assay specificity (Chappuis et al., 2006). All these considerations explain why there is no consensus on the best serological assay for the diagnosis of zoonotic VL. Most studies agree that rK39-based ICT represents a good solution in terms of user-friendliness, field applicability, and performance (Bangert et al., 2018; Boelaert et al., 2014; Carvalho et al., 2003; Cota et al., 2013; de Assis et al., 2011; Delgado et al., 2001; Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019; Krepis et al., 2018; Maia et al., 2012; Peruhype-Magalhães et al., 2012). However, this assay should always be associated with at least another serological assay to increase the diagnosis sensitivity. Several studies suggested the use of DAT in addition to ICT because its gives reliable results in patients with HIV (Bangert et al., 2018; Cota et al., 2012, 2013; Freire et al., 2019). In conclusion, when choosing a serological test, its feasibility, sustainability, local population, and field applicability should be taken into account (Elmahallawy et al., 2014). When considering the cost of VL diagnosis and treatment, the most cost-effective strategy appears to be diagnosis using ICT followed by treatment with liposomal amphotericin B (Assis et al., 2019).

7. Serological diagnosis of human tegumentary leishmaniasis due to zoonotic species

CL affect between 1 and 1.5 million people per year worldwide (den Boer et al., 2011). Generally, cutaneous lesions are crusted papules or ulcers on exposed skin, localized at the site of the parasite inoculation by sandflies. In the Old World, the most consistently zoonotic dermotropic species are *L. major* (Central Asia, West, North and East Africa, Near and Middle East). In the New World, they include species with a large South American distribution (*L. amazonensis, L. braziliensis* and *L. guyanensis*), species more localized in Central America (*Leishmania mexicana, Leishmania panamensis*), and other species with a restricted geographical territory (*Leishmania peruviana, Leishmania naiffi,* and the two Brazilian species *Leishmania shawi* and *Leishmania lainsoni*). MCL is a specific clinical entity mainly due to *L. braziliensis* that is widespread from southern Mexico to northern Argentina. The metastatic mucosal involvement is secondary to the cutaneous lesion, and appears several years after the first skin lesions. In several studies, serological tests have been used for CL and MCL diagnosis because they are minimally invasive and easy to perform. However, their lack of sensitivity and specificity greatly limits their diagnostic usefulness. In

TL, species identification is required to adapt the treatment, and parasitological diagnosis remains the cornerstone for diagnosis. For TL caused by *L. infantum*, case reports and literature data show that WB could contribute to the biological diagnosis (del Giudice et al., 1998). Similarly, for CL due to *L. major*, 47% and 100% of infected patients were identified as positive by IFAT and WB, respectively, in Algeria, Morocco and Tunisia (Pomares et al., 2012), and 96.7% by WB in Iran (Ashrafmansouri et al., 2015). ICT and rK39 ELISA assays gave positive results only in 10.2% and 28.8%, respectively, of soldiers infected in Iraq or Afghanistan (Hartzell et al., 2008). In the American continent, initial studies on TL/CL in Brazil reported low sensitivities for IFAT (27.7%) and ELISA (66.9%) (Guimarães et al., 1990). In another study, their sensitivity was 75.4% and 95.7%, respectively (Barroso-Freitas et al., 2009). A new assay based on the recombinant rLb6H antigen displayed 100.0% sensitivity and 98.5% specificity in sera from patients with American TL (Sato et al., 2017). The same authors also found that ELISA assays based on novel antigens show better sensitivity and specificity for the diagnosis of American TL compared with the standard ELISA based on soluble *Leishmania* antigens (Zanetti et al., 2019). In conclusion, the serological assay for the routine diagnosis of TL remains to be defined. Additional well-conducted studies are needed to clearly define the interest of serology for TL diagnosis. Currently, WB should be preferred when skin sampling is not easy to perform or in the case of MCL.

8. Concluding remarks

VL and to a lesser extent CL and MCL are the clinical expression of zoonotic leishmaniases. VL is a life-threatening disease and accurate diagnosis is required for its prompt and correct management. Indeed, false positive or false negative test results will lead to inadequate treatment and potentially to a fatal outcome (Chappuis et al., 2006; Freire et al., 2019). This highlights the fact that the diagnosis of zoonotic leishmaniases is based not only on the result of a biological assay, but also on the patient's clinical examination, the understanding of the assay performance, and the follow-up and re-evaluation of the diagnostic hypotheses. The currently available serological assays have specific limits and advantages, and the choice of the assay(s) to be implemented in laboratories should be based on their performance, feasibility, and cost-effectiveness ratio. In remote areas, ICT is a good option for field testing, whereas in equipped laboratories, a panel of assays can be performed to increase sensitivity (Table 1). ELISA, IFAT and DAT have the advantage to give a titer. However, performances vary among the different ELISA assays and this should be taken into account as well as the *in-situ* validation when choosing a test. IFAT is quite complicated to set up because of the need of trained personnel and a fluorescence microscope. Several studies promoted DAT; however, the lack of commercially available kits limits its diffusion. WB is a qualitative assay and could be indicated for the detection of asymptomatic carriage in immunocompromised patients at risk of VL. In France, health policies recommend the use of PCR for the diagnosis of VL, CL and MCL, and the follow-up of VL. Serological diagnosis should be performed first by ELISA or IFAT for the diagnosis of VL, CL and MCL. Then, WB is used as a confirmatory assay when at least one of these screening assays is positive (Haute Autorité de Santé, 2017). Currently, PCR is necessary for the accurate diagnosis of VL if the serological test results are negative, especially in immunocompromised patients. Indeed, PCR is more sensitive than parasitological diagnosis made by microscopic examination and parasite culture. During the follow-up, PCR allows the accurate monitoring of the response to treatment. However, to date, this assay is limited to referral laboratories and research centers. In conclusion, serology is a good tool for VL diagnosis and when possible, at least two assays should be performed to increase the sensitivity. Nevertheless, laboratory assays should always

In review

be considered with the clinical signs, and a diagnosis of TL should not be ruled out based only on a negative test result.

References

Adams, E. R., Jacquet, D., Schoone, G., Gidwani, K., Boelaert, M., and Cunningham, J. (2012). Leishmaniasis Direct Agglutination Test: Using Pictorials as Training Materials to Reduce Inter-Reader Variability and Improve Accuracy. *PLoS Negl Trop Dis* 6. doi:10.1371/journal.pntd.0001946.

Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., et al. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis* 10, e0004349. doi:10.1371/journal.pntd.0004349.

Asfaram, S., Hosseini Teshnizi, S., Fakhar, M., Banimostafavi, E. S., and Soosaraei, M. (2018). Is urine a reliable clinical sample for the diagnosis of human visceral leishmaniasis? A systematic review and meta-analysis. *Parasitol. Int.* 67, 575–583. doi:10.1016/j.parint.2018.05.008.

Ashrafmansouri, M., Sarkari, B., Hatam, G., Habibi, P., and Abdolahi Khabisi, S. (2015). Utility of Western Blot Analysis for the Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 10, 599–604.

Assis, T. S. M. de, Rabello, A., Cota, G., Werneck, G. L., and Azeredo-da-Silva, A. L. F. de (2019). Cost-effectiveness analysis of diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 52, e20180272. doi:10.1590/0037-8682-0272-2018.

Bangert, M., Flores-Chávez, M. D., Llanes-Acevedo, I. P., Arcones, C., Chicharro, C., García, E., et al. (2018). Validation of rK39 immunochromatographic test and direct agglutination test for the diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis in Spain. *PLoS Negl Trop Dis* 12, e0006277. doi:10.1371/journal.pntd.0006277.

Barroso-Freitas, A. P. T., Passos, S. R. L., Mouta-Confort, E., Madeira, M. F., Schubach, A. O., Santos, G. P. L., et al. (2009). Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 383–389. doi:10.1016/j.trstmh.2008.12.019.

Bekele, F., Belay, T., Zeynudin, A., and Hailu, A. (2018). Visceral leishmaniasis in selected communities of Hamar and Banna-Tsamai districts in Lower Omo Valley, South West Ethiopia: Sero-epidemological and Leishmanin Skin Test Surveys. *PLoS ONE* 13, e0197430. doi:10.1371/journal.pone.0197430.

Biglino, A., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuoglio, A., Romano, A., and Ferroglio, E. (2010). Asymptomatic *Leishmania infantum* infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. *J. Clin. Microbiol.* 48, 131–136. doi:10.1128/JCM.00416-09.

Boelaert, M., Verdonck, K., Menten, J., Sunyoto, T., van Griensven, J., Chappuis, F., et al. (2014). Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. *Cochrane Database Syst Rev*, CD009135. doi:10.1002/14651858.CD009135.pub2.

Brandonisio, O., Fumarola, L., Maggi, P., Cavaliere, R., Spinelli, R., and Pastore, G. (2002). Evaluation of a rapid immunochromatographic test for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 21, 461–464. doi:10.1007/s10096-002-0739-8.

In review

Carvalho, A. M. R. S., Mendes, T. A. de O., Coelho, E. A. F., Duarte, M. C., and Menezes-Souza, D. (2018). New antigens for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis identified by immunogenomic screening. *PLoS ONE* 13, e0209599. doi:10.1371/journal.pone.0209599.

Carvalho, S. F. G., Lemos, E. M., Corey, R., and Dietze, R. (2003). Performance of recombinant K39 antigen in the diagnosis of Brazilian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 321–324.

Celeste, B. J., Arroyo Sanchez, M. C., Ramos-Sanchez, E. M., Castro, L. G. M., Lima Costa, F. A., and Goto, H. (2014). Recombinant *Leishmania infantum* heat shock protein 83 for the serodiagnosis of cutaneous, mucosal, and visceral leishmaniases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 90, 860–865. doi:10.4269/ajtmh.13-0623.

Chappuis, F., Rijal, S., Soto, A., Menten, J., and Boelaert, M. (2006). A meta-analysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ* 333, 723. doi:10.1136/bmj.38917.503056.7C.

Costa, L. E., Salles, B. C. S., Santos, T. T. O., Ramos, F. F., Lima, M. P., Lima, M. I. S., et al. (2017). Antigenicity of phage clones and their synthetic peptides for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniasis. *Microb. Pathog.* 110, 14–22. doi:10.1016/j.micpath.2017.06.020.

Cota, G. F., de Sousa, M. R., de Freitas Nogueira, B. M., Gomes, L. I., Oliveira, E., Assis, T. S. M., et al. (2013). 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.* 89, 570–577. doi:10.4269/ajtmh.13-0239.

Cota, G. F., de Sousa, M. R., Demarqui, F. N., and Rabello, A. (2012). The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1665. doi:10.1371/journal.pntd.0001665.

Cruz, I., Chicharro, C., Nieto, J., Bailo, B., Cañavate, C., Figueras, M.-C., et al. (2006). Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2343–2347. doi:10.1128/JCM.02297-05.

De Almeida Silva, L., Romero, H. D., Prata, A., Costa, R. T., Nascimento, E., Carvalho, S. F. G., et al. (2006). Immunologic tests in patients after clinical cure of visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 739–743.

de Assis, T. S. M., Braga, A. S. da C., Pedras, M. J., Oliveira, E., Barral, A., de Siqueira, I. C., et al. (2011). Multi-centric prospective evaluation of rk39 rapid test and direct agglutination test for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 81–85. doi:10.1016/j.trstmh.2010.09.004.

de Korte, P. M., Harith, A. E., Dereure, J., Huigen, E., Faucherre, V., and van der Kaay, H. J. (1990). Introduction of an improved direct agglutination test for the detection of Leishmania infantum infection in southern France. *Parasitol. Res.* 76, 526–530.

de Ruiter, C. M., van der Veer, C., Leeflang, M. M. G., Deborggraeve, S., Lucas, C., and Adams, E. R. (2014). Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy. *J. Clin. Microbiol.* 52, 3147–3155. doi:10.1128/JCM.00372-14.

del Giudice, P., Marty, P., Lacour, J. P., Perrin, C., Pratlong, F., Haas, H., et al. (1998). Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. Case reports and literature review. *Arch Dermatol* 134, 193–198.

Delgado, O., Feliciangeli, M. D., Coraspe, V., Silva, S., Perez, A., and Arias, J. (2001). Value of a dipstick based on recombinant RK39 antigen for differential diagnosis of American visceral leishmaniasis from other sympatric endemic diseases in Venezuela. *Parasite* 8, 355–357. doi:10.1051/parasite/2001084355.

den Boer, M., Argaw, D., Jannin, J., and Alvar, J. (2011). Leishmaniasis impact and treatment access. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1471–1477. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03635.x.

Deniau, M., Cañavate, C., Faraut-Gambarelli, F., and Marty, P. (2003). The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol* 97 Suppl 1, 115–133. doi:10.1179/000349803225002598.

Dias, D. S., Ribeiro, P. A. F., Martins, V. T., Lage, D. P., Ramos, F. F., Dias, A. L. T., et al. (2018a). Recombinant prohibitin protein of *Leishmania infantum* acts as a vaccine candidate and diagnostic marker against visceral leishmaniasis. *Cell. Immunol.* 323, 59–69. doi:10.1016/j.cellimm.2017.11.001.

Dias, D. S., Ribeiro, P. A. F., Salles, B. C. S., Santos, T. T. O., Ramos, F. F., Lage, D. P., et al. (2018b). Serological diagnosis and prognostic of tegumentary and visceral leishmaniasis using a conserved *Leishmania* hypothetical protein. *Parasitol. Int.* 67, 344–350. doi:10.1016/j.parint.2018.02.001.

Díaz-Sáez, V., Merino-Espinosa, G., Morales-Yuste, M., Corpas-López, V., Pratlong, F., Morillas-Márquez, F., et al. (2014). High rates of *Leishmania infantum* and *Trypanosoma nabiasi* infection in wild rabbits (Oryctolagus cuniculus) in sympatric and syntrophic conditions in an endemic canine leishmaniasis area: epidemiological consequences. *Vet. Parasitol.* 202, 119–127. doi:10.1016/j.vetpar.2014.03.029.

dos Santos, J. I., Morgado, M. G., and Galvão-Castro, B. (1987). Human visceral leishmaniasis: analysis of the specificity of humoral immune response to polypeptides of *Leishmania donovani chagasi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 263–270. doi:10.4269/ajtmh.1987.37.263.

Duarte, M. C., Lage, D. P., Martins, V. T., Costa, L. E., Salles, B. C. S., Carvalho, A. M. R. S., et al. (2017). Performance of *Leishmania braziliensis* enolase protein for the serodiagnosis of canine and human visceral leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 238, 77–81. doi:10.1016/j.vetpar.2017.03.024.

Elmahallawy, E. K., Sampedro Martinez, A., Rodriguez-Granger, J., Hoyos-Mallecot, Y., Agil, A., Navarro Mari, J. M., et al. (2014). Diagnosis of leishmaniasis. *J Infect Dev Ctries* 8, 961–972. doi:10.3855/jidc.4310.

Engvall, E., and Perlmann, P. (1972). Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.* 109, 129–135.

Evans, T. G., Krug, E. C., Wilson, M. E., Vasconcelos, A. W., de Alencar, J. E., and Pearson, R. D. (1989). Evaluation of antibody responses in American visceral leishmaniasis by ELISA and immunoblot. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84, 157–166. doi:10.1590/s0074-02761989000200003.

Farahmand, M., and Nahrevanian, H. (2016). Application of Recombinant Proteins for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis in Humans and Dogs. *Iran. Biomed. J.* 20, 128–134.

Farajnia, S., Darbani, B., Babaei, H., Alimohammadian, M. H., Mahboudi, F., and Gavgani, A. M. (2008). Development and evaluation of *Leishmania infantum* rK26 ELISA for serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Iran. *Parasitology* 135, 1035–1041. doi:10.1017/S003118200800454X.

Ferrua, B., Rol, N., Michel, G., and Marty, P. (2009). Antigenemia in patients with mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 47, 3760–3762. doi:10.1128/JCM.00649-09.

Freire, M. L., Machado de Assis, T., Oliveira, E., Moreira de Avelar, D., Siqueira, I. C., Barral, A., et al. (2019). Performance of serological tests available in Brazil for the

In review

diagnosis of human visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 13, e0007484. doi:10.1371/journal.pntd.0007484.

Guimarães, M. C., Celeste, B. J., and Franco, E. L. (1990). Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull. World Health Organ.* 68, 39–43.

Hartzell, J. D., Aronson, N. E., Weina, P. J., Howard, R. S., Yadava, A., and Wortmann, G. W. (2008). Positive rK39 serologic assay results in US servicemen with cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 843–846.

Haute Autorité de Santé (2017). Actualisation des actes de biologie médicale relatifs au diagnostic de la leishmaniose.

Heidari, S., Gharechahi, J., Mohebali, M., Akhoundi, B., Mirshahvaladi, S., Azarian, B., et al. (2019). Western Blot Analysis of *Leishmania infantum* Antigens in Sera of Patients with Visceral Leishmaniasis. *Iran J Parasitol* 14, 10–19.

Krepis, P., Krepi, A., Argyri, I., Aggelis, A., Soldatou, A., Papaevangelou, V., et al. (2018). Childhood Visceral Leishmaniasis: Distinctive Features and Diagnosis of a Re-emerging Disease. An 11-year Experience From a Tertiary Referral Center in Athens, Greece. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 37, 419–423. doi:10.1097/INF.0000000000001797.

Kühne, V., and Büscher, P. (2019). The Unknown Nature of the Antigen in the Direct Agglutination Test for Visceral Leishmaniasis Hampers Development of Serodiagnostic Tests. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 100, 246–255. doi:10.4269/ajtmh.18-0740.

Lachaud, L., Chabbert, E., Dubessay, P., Dereure, J., Lamothe, J., Dedet, J. P., et al. (2002). Value of two PCR methods for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis and the detection of asymptomatic carriers. *Parasitology* 125, 197–207. doi:10.1017/s0031182002002081.

Lakhal, S., Mekki, S., Ben-Abda, I., Mousli, M., Amri, F., Aoun, K., et al. (2012). Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay based on crude *Leishmania* histone proteins for serodiagnosis of human infantile visceral leishmaniasis. *Clin. Vaccine Immunol.* 19, 1487–1491. doi:10.1128/CVI.00257-12.

Maalej, I. A., Chenik, M., Louzir, H., Ben Salah, A., Bahloul, C., Amri, F., et al. (2003). Comparative evaluation of ELISAs based on ten recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 68, 312–320.

Magalhães, F. B., Castro Neto, A. L., Nascimento, M. B., Santos, W. J. T., Medeiros, Z. M., Lima Neto, A. S., et al. (2017). Evaluation of a new set of recombinant antigens for the serological diagnosis of human and canine visceral leishmaniasis. *PLoS ONE* 12, e0184867. doi:10.1371/journal.pone.0184867.

Maia, Z., Lírio, M., Mistro, S., Mendes, C. M. C., Mehta, S. R., and Badaro, R. (2012). Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6, e1484. doi:10.1371/journal.pntd.0001484.

Marty, P., Lelièvre, A., Quaranta, J. F., Suffia, I., Eulalio, M., Gari-Toussaint, M., et al. (1995). Detection by Western blot of four antigens characterizing acute clinical leishmaniasis due to *Leishmania infantum*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 89, 690–691. doi:10.1016/0035-9203(95)90447-6.

Mary, C., Lamouroux, D., Dunan, S., and Quilici, M. (1992). 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.* 47, 764–771. doi:10.4269/ajtmh.1992.47.764.

In review

Menezes-Souza, D., Mendes, T. A. de O., Gomes, M. de S., Bartholomeu, D. C., and Fujiwara, R. T. (2015). Improving serodiagnosis of human and canine leishmaniasis with recombinant *Leishmania braziliensis* cathepsin l-like protein and a synthetic peptide containing its linear B-cell epitope. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e3426. doi:10.1371/journal.pntd.0003426.

Mikaeili, F., Fakhar, M., Sarkari, B., Motazedian, M. H., and Hatam, G. (2007). Comparison of serological methods (ELISA, DAT and IFA) for diagnosis of visceral leishmaniasis utilizing an endemic strain. *Iran J Immunol* 4, 116–121. doi:IJIv4i2A7.

Millesimo, M., Zucca, M., Caramello, P., and Savoia, D. (1996). Evaluation of the immune response in visceral leishmaniasis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 7–11.

Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., et al. (2012). The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* 190, 268–271. doi:10.1016/j.vetpar.2012.05.006.

Nigro, L., Vinci, C., Romano, F., and Russo, R. (1996). 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.* 15, 832–835.

Ntais, P., Sifaki-Pistola, D., Christodoulou, V., Messaritakis, I., Pratlong, F., Poupalos, G., et al. (2013). Leishmaniases in Greece. *Am J Trop Med Hyg* 89, 906–915. doi:10.4269/ajtmh.13-0070.

Oliveira, E., Oliveira, D., Cardoso, F. A., Barbosa, J. R., Marcelino, A. P., Dutra, T., et al. (2017). Multicentre evaluation of a direct agglutination test prototype kit (DAT-LPC) for diagnosis of visceral leishmaniasis. *Parasitology* 144, 1964–1970. doi:10.1017/S0031182017001378.

Oliveira, E., Pedras, M. J., Assis, I. E. M. de, and Rabello, A. (2009). Improvement of direct agglutination test (DAT) for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103, 1279–1281. doi:10.1016/j.trstmh.2009.04.007.

Oliveira, E., Saliba, S. W., Andrade, C. F. de, and Rabello, A. (2011). Direct agglutination test (DAT): improvement of biosafety for laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 105, 414–416. doi:10.1016/j.trstmh.2011.04.010.

Oliveira, E., Saliba, S. W., Saliba, J. W., and Rabello, A. (2013). Validation of a direct agglutination test prototype kit for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 107, 243–247. doi:10.1093/trstmh/trt004.

Pedras, M. J., de Gouvêa Viana, L., de Oliveira, E. J., and Rabello, A. (2008). Comparative evaluation of direct agglutination test, rK39 and soluble antigen ELISA and IFAT for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 102, 172–178. doi:10.1016/j.trstmh.2007.11.004.

Peruhype-Magalhães, V., Machado-de-Assis, T. S., and Rabello, A. (2012). Use of the Kala-Azar Detect® and IT-LEISH® rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107, 951–952. doi:10.1590/s0074-02762012000700019.

Pinedo-Cancino, V., Kesper, N., Barbiéri, C. L., Lindoso, J. A. L., and Umezawa, E. S. (2013). The efficacy of *L.* (*L.*) *chagasi* excreted-secreted antigens (ESAs) for visceral leishmaniasis diagnosis is due to low levels of cross-reactivity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 559–565. doi:10.4269/ajtmh.12-0587.

Pomares, C., Despierres, L., del Giudice, P., Delaunay, P., Michel, G., Ferrua, B., et al. (2012). Western blot analysis as an aid for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 106, 452–454. doi:10.1016/j.trstmh.2012.03.001.

In review

Portela, Á. S. B., Costa, L. E., Salles, B. C. S., Lima, M. P., Santos, T. T. O., Ramos, F. F., et al. (2018). Identification of immune biomarkers related to disease progression and treatment efficacy in human visceral leishmaniasis. *Immunobiology* 223, 303–309. doi:10.1016/j.imbio.2017.10.043.

Ribeiro, P. A. F., Dias, D. S., Lage, D. P., Costa, L. E., Salles, B. C. S., Steiner, B. T., et al. (2018). A conserved Leishmania hypothetical protein evaluated for the serodiagnosis of canine and human visceral and tegumentary leishmaniasis, as well as a serological marker for the posttreatment patient follow-up. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 92, 196–203. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.026.

Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M., et al. (2008). Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion* 48, 1383–1389. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01708.x.

Saghrouni, F., Khammari, I., Kaabia, N., Bouguila, J., Ben Abdeljelil, J., Fathallah, A., et al. (2012). Asymptomatic carriage of *Leishmania* in family members of patients with visceral leishmaniasis in Central Tunisia. *Pathol. Biol.* 60, e55-58. doi:10.1016/j.patbio.2011.11.001.

Sakkas, H., Gartzonika, C., and Levidiotou, S. (2016). Laboratory diagnosis of human visceral leishmaniasis. *J Vector Borne Dis* 53, 8–16.

Sakru, N., Korkmaz, M., Ozbel, Y., Ertabaklar, H., Sengul, M., and Toz, S. O. (2007). Investigation of asymptomatic visceral leishmaniasis cases using western blot in an endemic area in Turkey. *New Microbiol.* 30, 13–18.

Santos-Gomes, G., Gomes-Pereira, S., Campino, L., Araújo, M. D., and Abranches, P. (2000). Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral Leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfected patients. *J. Clin. Microbiol.* 38, 175–178.

Sarkari, B., Ashrafmansouri, M., Hatam, G., Habibi, P., and Abdolahi Khabisi, S. (2014). Performance of an ELISA and Indirect Immunofluorescence Assay in Serological Diagnosis of Zoonotic Cutaneous Leishmaniasis in Iran. *Interdiscip Perspect Infect Dis* 2014. doi:10.1155/2014/505134.

Sarkari, B., Rezaei, Z., and Mohebali, M. (2018). Immunodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Current Status and Challenges: A Review Article. *Iran J Parasitol* 13, 331–341.

Sato, C. M., Sanchez, M. C. A., Celeste, B. J., Duthie, M. S., Guderian, J., Reed, S. G., et al. (2017). Use of Recombinant Antigens for Sensitive Serodiagnosis of American Tegumentary Leishmaniasis Caused by Different Leishmania Species. *J. Clin. Microbiol.* 55, 495–503. doi:10.1128/JCM.01904-16.

Seyyedtabaei, S. J., Rostami, A., Haghighi, A., Mohebali, M., Kazemi, B., Fallahi, S., et al. (2017). Detection of Potentially Diagnostic Leishmania Antigens with Western Blot Analysis of Sera from Patients with Cutaneous and Visceral Leishmaniases. *Iran J Parasitol* 12, 206–214.

Silva, E. S., Schoone, G. J., Gontijo, C. M., Brazil, R. P., Pacheco, R. S., and Schallig, H. D. (2005). Application of Direct Agglutination Test (DAT) and Fast Agglutination Screening Test (FAST) for sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in endemic area of Minas Gerais, Brazil. *Kinetoplastid Biology and Disease* 4, 4. doi:10.1186/1475-9292-4-4.

Stensvold, C. R., Høst, A. V., Belkessa, S., and Nielsen, H. V. (2019). Evaluation of the NovaLisa™ *Leishmania Infantum* IgG ELISA in A Reference Diagnostic Laboratory in A Non-Endemic Country. *Antibodies* 8, 20. doi:10.3390/antib8010020.

Tebourski, F., el Gaied, A., Louzir, H., Ben Ismail, R., Kammoun, R., and Dellagi, K. (1994). Identification of an immunodominant 32-kilodalton membrane protein of *Leishmania*

In review

donovani infantum promastigotes suitable for specific diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2474–2480.

Varani, S., Ortalli, M., Attard, L., Vanino, E., Gaibani, P., Vocale, C., et al. (2017). Serological and molecular tools to diagnose visceral leishmaniasis: 2-years' experience of a single center in Northern Italy. *PLoS ONE* 12, e0183699. doi:10.1371/journal.pone.0183699.

World Health Organization ed. (2010a). Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22 - 26 March 2010. Geneva: World Health Organization.

World Health Organization (2010b). Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance WHO Diagnostic Evaluation Series.

Zanetti, A. D. S., Sato, C. M., Longhi, F. G., Ferreira, S. M. B., and Espinosa, O. A. (2019). Diagnostic accuracy of Enzyme-Linked Immunosorbent Assays to detect anti-Leishmania antibodies in patients with American Tegumentary Leishmaniasis: a systematic review. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 61, e42. doi:10.1590/S1678-9946201961042.

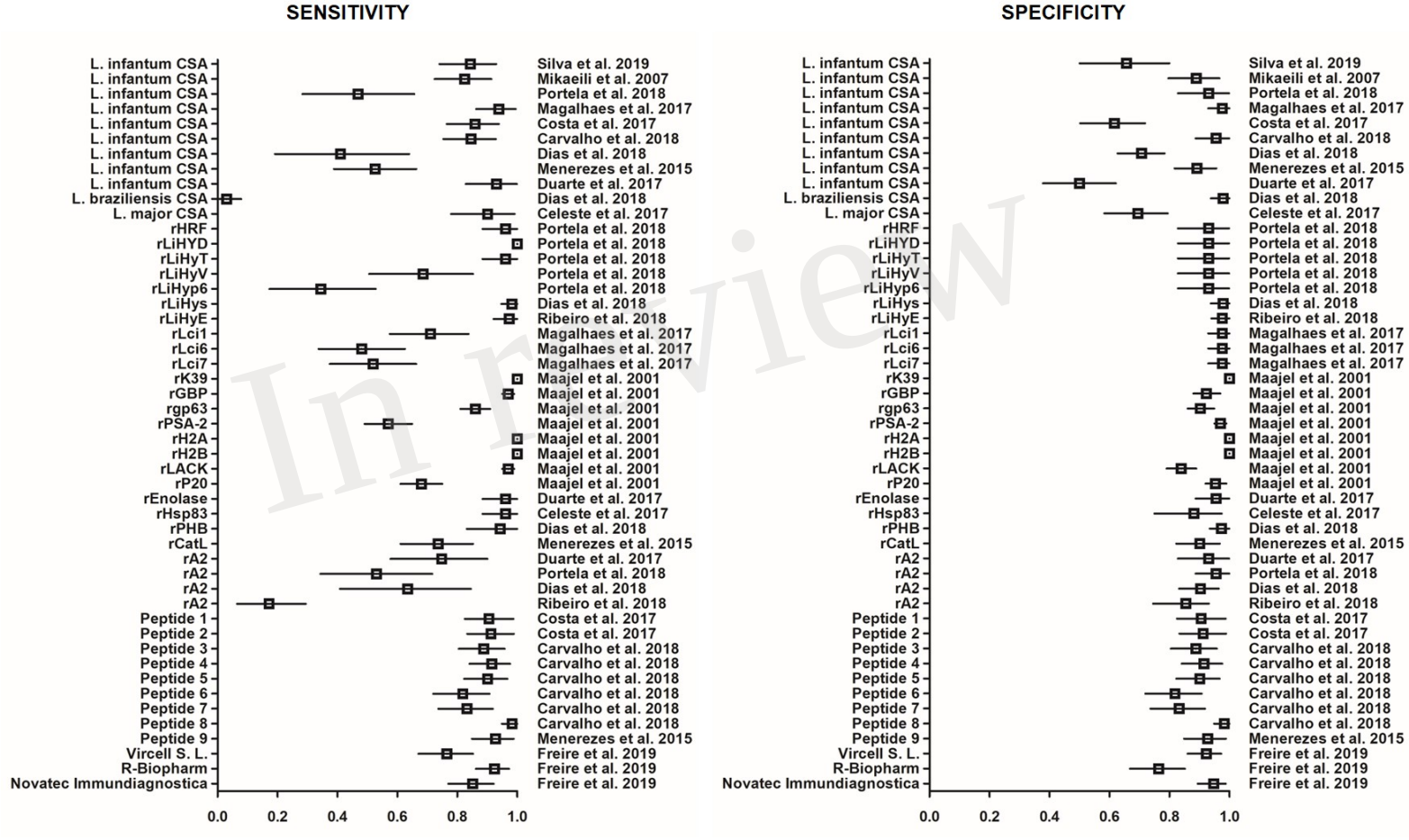
Table 1. Recommended assays according to the healthcare facility level

Healthcare facility level	Recommended assays
Field application	ICT
Laboratory with minimal equipment	ICT plus DAT
Laboratory with intermediate equipment	2 serological assays among ELISA, DAT, ICT ± microscopy and culture, if microscope and trained personnel available
Reference laboratory	Serological assays (ELISA, DAT, ICT, western blotting, IFAT), microscopy examination, culture and PCR

In review

Figure 1. Forest plot showing the sensitivity and specificity of ELISA based on various antigens for the diagnosis of VL in immunocompetent patients. Each square represents the sensitivity or specificity estimated in the corresponding study. Horizontal lines represent the 95% CI. CSA: crude soluble antigens; r: recombinant; Peptide 1: LSFPFPG; Peptide 2: CFTSFSPY; Peptide 3: SGAPRANNSGDASA; Peptide 4: GLSGEGSPASPEPRLAGGGGGADTQSTT; Peptide 5: DGKPKENQKTARES; Peptide 6: VADSGSASSEDGGSAKP; Peptide 7: PRKADPNDTTPQ; Peptide 8: GDSPPSDSPQNNQDRNRNQN; Peptide 9: QTSGSTTPGPTTTTK.

Figure 1.JPEG



In review

DEUXIEME PARTIE :

Travail personnel

1. Introduction au travail

Le diagnostic de la leishmaniose viscérale est un défi aussi bien chez les patients immunodéprimés qu'immunocompétents. Comme nous l'avons détaillé précédemment, différentes techniques sont disponibles pour le diagnostic de la LV. En France, l'HAS recommande pour le dépistage de la LV la mise en œuvre d'une technique sérologique dont un résultat positif doit être confirmé par Western Blot. Par ailleurs, elle préconise que le dépistage du parasite par PCR soit associé à la sérologie.

De nombreux tests sérologiques sont actuellement disponibles sur le marché, mais peu d'études comparatives incluant un nombre de patients suffisant ont été réalisées avec les tests commercialisés. Le but de notre étude était d'évaluer les performances (sensibilité, spécificité) de six tests sérologiques commercialisés en France : quatre tests ELISA et deux tests immuno-chromatographique de diagnostic rapide. La technique de western-blot considérée comme la technique de confirmation a aussi été évaluée. Pour cela, nous avons collecté de manière rétrospective les sérums de patients vivant en France, au Maroc ou en Tunisie et ayant une LV confirmée par une méthode parasitologique. Un groupe contrôle de patients n'ayant aucun signe clinique de leishmaniose et vivant en zone d'endémie a aussi été inclus.

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article. Ce travail a été soumis au journal PLOS Neglected Tropical Diseases.

2. Article soumis à PLOS Neglected Tropical Diseases

« Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis »

Evaluation of six commercial kits for the serological diagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis

Maude F Lévêque[1], Emilie Battery[2], Pascal Delaunay[3], Badre Eddine Lmimouni[4], Karim Aoun[5], Coralie L'Ollivier[6], Patrick Bastien[1], Charles Mary[6], Christelle Pomares[3], Judith Fillaux[7], Laurence Lachaud[1*]

[1] Département de Parasitologie-Mycologie Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Centre National de Référence des Leishmanioses, Université de Montpellier, UMR MIVEGEC, France

[2] Département de Parasitologie-Mycologie Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, France

[3] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie CHU Nice, France, INSERM U1065 Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire, France

[4] Hôpital militaire d'instruction Mohamed V, Laboratoire de parasitologie, Faculté de médecine et de pharmacie, Université Mohammed V, Rabat, Maroc.

[5] Laboratoire d'Epidémiologie et d'Ecologie Parasitaire & LR 16-IPT-06 "Parasitologie médicale, Biotechnologie et Biomolécules », Institut Pasteur de Tunis, Université Tunis-El Manar, Tunisie.

[6] Aix Marseille Univ, IRD, AP-HM, SSA, VITROME, IHU-Méditerranée Infection, Marseille, France

Short title: Performances of serological kits for zoonotic visceral leishmaniasis

Abstract

Background: Zoonotic visceral leishmaniasis (VL) is endemic in the Mediterranean basin. However, large-scale comparative analyses of the commercial kits for the serological diagnosis of this neglected disease are lacking. This study compared the performances of four enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) and two immunochromatographic tests (ICT) as screening tests for the serodiagnosis of human VL in the Mediterranean region.

Methodology/Principal findings: Serum samples from 319 patients living in France, Tunisia or Morocco were tested using two ICT (IT LEISH® and TruQuick™ LEISH IgG/IgM Meridian®) and four ELISA reagents (NovaLisa® *Leishmania infantum* IgG, Bordier® *Leishmania infantum*, Ridascreen® *Leishmania IgG,* and Vircell® *Leishmania*). The population with proven VL (n=181) included 65 immunocompromised patients. Significantly higher percentages of false-negative results were obtained with all assays in immunocompromised patients, compared with the immunocompetent population. In the whole population, sensitivity and specificity ranged from 80.7% to 93.9% and from 95.7% to 100%, respectively. The maximum accuracy was observed with the Bordier® and Vircell® ELISA kits (96.2%), and the lowest accuracy with Ridascreen® reagent (88.7%). New thresholds of positivity are proposed for the Bordier®, Vircell® and NovaLisa® ELISA kits to achieve 95% sensitivity with the highest possible specificity. Western blot (WB), used as a confirmation method, showed 100% sensitivity and identified 10.1% of asymptomatic carriers among the control population from the South of France.

Conclusions/Significance: This is the first study that compared commercially available kits for VL serodiagnosis in the endemic region of the Mediterranean basin. It provides specific information about the tests' performance to help clinicians and biologists to select the right assay for VL screening.

Keywords:

Leishmania infantum, antibodies, ELISA, western blot, immunochromatography, tests evaluation

Author Summary

Human visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease endemic in the Mediterranean region, caused by *Leishmania infantum*. Accurate VL diagnosis is critical for rapid and correct patient management. Various serological tests are used, including commercial kits that require

qualifications with specific information about their performance. In this study, we compared the performance of six commercial kits, two immunochromatographic tests (ICT; IT LEISH® and TruQuick™ LEISH IgG/IgM Meridian®) and four enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA; NovaLisa® *Leishmania infantum* IgG, Bordier® *Leishmania infantum*, Ridascreen® *Leishmania IgG,* and Vircell® *Leishmania*), available in France and used as screening tests. The Bordier® and Vircell® ELISA reagents displayed the highest analytic performance compared with all the other kits. However, no test displayed 95% sensitivity at the thresholds recommended by the manufacturers. To reach this sensitivity value with the highest possible specificity, new thresholds are proposed for the Bordier®, Vircell® and NovaLisa® ELISA reagents. Positive and negative results obtained with the six screening tests were confirmed by Western blot (100% sensitivity). Overall, this study presents a comparative analysis of commercially available kits for the serodiagnosis of human VL, and provides additional information on the prevalence of asymptomatic carriers in the Mediterranean basin.

45 **Introduction**

46 Human visceral leishmaniasis (VL) caused by *Leishmania infantum* is a neglected, yet severe,
47 zoonotic disease that occurs mainly in Latin America and in the Mediterranean region (1). Dogs
48 are the main reservoir of *L. infantum* parasites that are transmitted to humans by the bite of
49 infected phlebotomine sandflies. In humans, the infection can be asymptomatic or lead to an
50 acute form characterized by irregular fever, weight loss, splenomegaly, hepatomegaly, anaemia
51 or pancytopenia (2). If left untreated, the infection is often fatal. Accurate diagnosis, which is
52 crucial to control the infection, relies on epidemiological data, clinical features, and laboratory
53 tests. Parasite detection by microscopic examination of bone marrow aspirates is the gold
54 standard method, but lacks sensitivity and requires invasive procedures (3). The culture of
55 parasites isolated from patients might improve the diagnostic sensitivity. The search of specific
56 antibodies in serum or plasma, while requiring non-invasive sampling, remains the most widely
57 used method for VL diagnosis. However, serological tests tend to be less sensitive in children
58 younger than three years (4,5) and in immunocompromised patients (6,7). Currently, molecular
59 detection is considered the most reliable method (8,9), with a sensitivity higher than 95% for
60 PCR analysis on peripheral blood (10). Yet, such technique is restricted to well-equipped
61 laboratories and is often combined with serological tests in the routine practices (3).

62 Various methods are used for VL serodiagnosis. The qualitative detection of *Leishmania*
63 antibodies is based on Western blot (WB) method and immunochromatographic tests (ICT),
64 whereas quantitative results are obtained by indirect immunofluorescence, direct agglutination,
65 and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). The WB technique, using *L. infantum*
66 antigenic fractions, is a highly sensitive and specific method to confirm VL serodiagnosis
67 (11,12). This technique is time-consuming and quite expensive, thus complex to implement for
68 field surveys and initial serological screenings. Conversely, ICT which are based on the
69 recombinant *Leishmania* rk39 antigen, are well adapted for field testing. Indeed, they are fast
70 and easy to perform, and display good performances for early VL diagnosis (13). Among the
71 quantitative methods, ELISA based on crude soluble antigens or the recombinant rk39 protein,
72 are widely used for initial screening of VL (3,7), but their performances are influenced by the
73 nature, purity and stability of the used antigens (14). In this context, commercial kits may offer
74 more uniform procedures for antigen preparation, compared with home-made assays, and
75 provide standardized experimental conditions. However, large-scale studies comparing the
76 performances of commercial assays are lacking (5,7). A recent study in Brazil compared, for
77 the first time, different kits tested in the same condition and in the same population (5).

78 Similarly, in the present study, we evaluated the performances of six commercial tests for the
79 diagnosis of human VL in the Mediterranean region. We compared the sensitivity and
80 specificity of two ICT and four ELISA kits, re-evaluated their positivity thresholds, and
81 analysed their advantages and drawbacks for routine diagnosis. Finally, we use a Western blot
82 technique to confirm the serological status of VL and healthy patients, and discuss discrepant
83 positive results obtained in some asymptomatic patients living in the South of France, a VL
84 endemic area in the Mediterranean basin.

85 Material and Methods

86 Study site

87 This study was carried out at the Parasitology and Mycology Department of Montpellier
88 University Hospital, France, on behalf the French National Reference Centre of Leishmaniasis
89 (Centre National de Référence sur les Leishmanioses, CNRL) from January to August 2019.

90 Study design and human samples

91 Six commercial kits were evaluated using human serum samples collected between 1998 and
92 2018 and stored at -20°C at the University Hospitals of Montpellier (n=171), Nice (n=138) and
93 Marseille (n=5), France, at the Mohamed V Military Hospital of Rabat (n=16), Morocco, and
94 at the Pasteur Institute of Tunis (n=10), Tunisia. In total, 340 samples were analysed for this
95 comparative study. All samples were sent to the CNRL for epidemiological and analytical
96 purposes and stored at -20°C. Among the serum samples, 202 VL-positive samples were
97 selected to reach a sensitivity of 95% and a precision of 3%. Positive samples were from
98 patients who lived in the Mediterranean basin and displayed at least one clinical sign of VL
99 (*i.e.,* splenomegaly, hepatomegaly, anaemia leukopenia, or thrombocytopenia). VL diagnosis
100 in these patients was confirmed by microscopic detection of the parasites, culture, or PCR
101 analysis. To reach a minimum specificity of 90% and a precision of 5%, 138 negative serum
102 samples were included. Negative samples were from immunocompetent patients who lived in
103 the South of France, and did not have any typical symptom or previous history of VL.

104 Ethics statement

105 This study was approved by the Committee of Research Ethics of the Montpellier University
106 Hospital (IRB protocol number: 2019_IRB_MTP_03-03). Human serum samples were
107 anonymised, and diagnostic tests were performed in blinded conditions. This work was carried
108 out in accordance with the relevant guidelines and regulations, and does not provide any
109 information that may allow the identification of the enrolled patients.

110 **Serological assays**

111 Commercial kits available in France to detect human antibodies against *Leishmania* were used
112 in this study. Four ELISA kits were included: NovaLisa® *Leishmania infantum* IgG, Bordier®
113 *Leishmania infantum*, Ridascreen® *Leishmania IgG,* and Vircell® *Leishmania*. All four assays
114 were carried out on the Evolis (BIO-RAD) automate using the programs recommended by the
115 manufacturers. For the screening by ICT, samples were processed manually using the IT
116 LEISH® and TruQuick™ LEISH IgG/IgM Meridian® tests, according to the manufacturers'
117 instructions. For western blotting, the LDBio® *Leishmania* IgG kit was used with the Autoblot
118 3000 (MedTEC) apparatus according to the manufacturer's instructions. Specific bands at 14
119 kDa or 16 kDa demonstrated the presence of anti-*Leishmania* antibodies in the sample. The
120 characteristics of each test are listed in Table 1.

121 **Statistical analysis**

122 The characteristics of the studied population were described using percentages and medians
123 along with interquartile ranges instead of means and standard deviations when distributions
124 were found to be non-Gaussian. Screening tests were evaluated against parasitological
125 diagnosis. Sensitivity and specificity were calculated using all the serum samples included in
126 the study. Results were analysed using Receiving Operating Characteristic (ROC) curves to
127 determine the most suitable threshold(s) for each quantitative screening test. Sensitivity and
128 specificity values were compared by testing the equality of proportions. The areas under the
129 curve (AUC) were compared with the $\chi 2$ test. The significance threshold was set at 5%. All
130 statistical tests and procedures were performed using the Intercooled Stata 9.2 statistical
131 package (StataCorp, College Station, TX).

132 Results

133 **Characteristics of the population, samples, and assays**

134 We screened serum samples from patients living in France, Tunisia and Morocco. Among the
135 VL population, the female to male sex ratio was 2:3, and age ranged from 1 to 93 years with a
136 median of 33 years [IQR 28-44]. Because of the low quantity of some samples, among the 340
137 sera included in this study, 339 sera were screened with LDBio®, 338 with IT-LEISH®, 335
138 with TruQuick®, 339 with Bordier® and Ridascreen®, 335 with NovaLisa®, and 322 with
139 Vircell®. Among these sera, a complete dataset was available for 319 samples. The VL
140 population (n=181) included 98 immunocompetent and 65 immunocompromised patients
141 (HIV: n= 49, transplantation: n=4, immunosuppressive treatments n=12), and 18 patients with

142 unknown immune status who were included in the immunocompetent group (n=116). Figure 1
143 presents the distribution of the index values obtained using the four ELISA kits, according to
144 patients' immune status, and shows that kits' specific values cannot be compared to each other.

145 **Comparison of the tests' performances**

146 To compare the performance of the different ICT and ELISA kits, we assessed their sensitivity,
147 specificity and accuracy in the 319 samples tested with all kits (Table 2). We interpreted the
148 results of the four ELISA kits using the cut-off values for antibody detection recommended by
149 the manufacturers (Table 1). Moreover, all values found in the grey zone were considered
150 positive as these samples are further analysed using another serological technique in the
151 laboratory routine. Overall, the sensitivity and specificity of the ICT and ELISA kits ranged
152 from 80.7% to 93.9% and from 95.7% to 100%, respectively. Among all tests, the highest
153 values were obtained with the Bordier® and Vircell® kits, both displaying 96.2% of accuracy.
154 When comparing the maximum likelihood ratio of ELISA calculated by the ROC curves, we
155 found that the Bordier® kit displayed significantly higher analytical performances than the
156 Ridascreen® and NovaLisa® assays, whereas it was comparable to Vircell® in the whole
157 population (Figure 2). Conversely, the four ELISA kits performed similarly when only samples
158 from immunocompetent patients with VL were considered. In immunocompromised patients,
159 the overall distribution of the index values was significantly lower than in the
160 immunocompetent population (Figure 1). Moreover, in the VL-positive group, the number of
161 false-negative results was significantly higher in immunocompromised patients than in the
162 immunocompetent population (Table 3).

163 **Threshold adjustment of ELISA reagents**

164 Sensitivity and specificity of 95% and 98%, respectively, are recommended for VL diagnosis
165 (5,15). However, in the whole population (n=319), none of the ELISA kits reached 95%
166 sensitivity using the thresholds recommended by the manufacturers, although specificity ranged
167 from 96.38% to 100%, (Table 2). Therefore, we estimated the positivity thresholds to obtain a
168 sensitivity of 95% with the highest possible specificity (Table 4). To reach these parameters,
169 all cut-off values had to be reduced. For instance, for the Bordier® kit, a decrease of the positive
170 threshold from 1 to 0.746 gave a specificity of 99.3%. After adjusting the positive cut-off, the
171 specificity of the Ridascreen® and NovaLisa® assays, were significantly lower than that of
172 Bordier®, while there was no statistical difference in between Bordier® and Vircell®.

173 **Results confirmation by western blotting**

174 Western blotting is used in the routine practice to confirm equivocal or positive results obtained
175 by initial screening tests. Western blot analysis of the serum samples from patients with proven
176 VL (n=181) confirmed the results in 100% of cases (Figure 3). On the other hand, in the control
177 population (n=138), 12 serum samples were identified as positive by at least one ICT or ELISA
178 kit. Analysis of these samples by western blotting indicated that seven samples were negative
179 (n=4 positive with NovaLisa®, n=2 positive with TruQuick®, and n=1 positive with
180 Ridascreen®, IT LEISH® and TruQuick® kits). On the other hand, we confirmed positive
181 detection in five samples (n=1 NovaLisa®, n=1 Vircell®, n=3 TruQuick®). Therefore, we
182 analysed all samples in the control group (n=138) to assess what was the percentage of patients
183 who did not present any symptoms of VL but displayed positive detection by Western blot. In
184 total, we found 14 positive samples (10.1%) in the control population.

185 ## Discussion

186 During the last 70 years, various methods have been used for the serodiagnosis of VL caused
187 by *L. infantum* in humans (16), including commercial kits that require qualifications with
188 specific information about their performance (5). In this study, we evaluated the analytical
189 performances of commercially available kits based on different methods: ELISA, ICT and WB.
190 The Vircell® and Bordier® ELISA kits displayed significantly higher accuracy rates in the
191 whole population than the other tests. Nevertheless, we had to decrease the cut-off values to
192 improve the performance of the four ELISA tests. For field studies, the TruQuick® ICT is the
193 most suitable with satisfactory performances. In immunocompromised patients, the index
194 values of all ELISA reagents were significantly lower than in the immunocompetent population
195 and false-negative results were more frequent, as shown previously (17). One of the limitations
196 of this study is that we did not include immunocompromised patients in the healthy population.
197 Consequently, we could not compare the tests' accuracy in function of the immune status.
198 Among the six assays used for antibody screening, none reached the recommended sensitivity
199 of 95% for VL diagnosis (14). Therefore, we lowered the positivity thresholds of the ELISA
200 reagents to obtain a sensitivity of 95% with the highest possible specificity. As no grey zone is
201 defined by the manufacturer of Bordier®, we recommend interpreting the index values between
202 0.7 and 1 as equivocal or positive results. By using these cut-off values, the Bordier® kit
203 displayed the highest specificity (>99%). We propose to broaden the cut-off values
204 recommended by the Vircell® manufacturer from 9-11 to 8-11, yielding a specificity
205 comparable to that of Bordier®. We also suggest reducing the NovaLisa® positivity threshold

206 from 9 to 6, although this would entail a significant decrease of specificity and the use of
207 additional confirmation tests, compared with the Bordier® and Vircell® assays. Moreover, the
208 cut-off values (1.5-11) of the Ridascreen® kit required to achieve a sensitivity of 95%
209 significantly reduced specificity (81.9%), therefore making this test unsuitable for routine
210 screening.
211 Few studies evaluated ICT performance for the diagnosis of zoonotic VL (15). However,
212 commercial ICT kits represent the best choice for rapid, easy and efficient serological screening
213 of VL (16). In this study, the performances of TruQuick® and IT-LEISH® were lower than
214 those of the Bordier® and Vircell® ELISA kits, but their estimated accuracy was comparable
215 to that of NovaLisa® and higher than that of the Ridascreen® ELISA kits in the whole
216 population. ICT present several advantages compared with ELISA kits in term of practicability.
217 First, TruQuick® and IT-LEISH® can be performed also on whole blood, thus facilitating
218 screening in field settings, although ICT performances for detecting specific anti-*Leishmania*
219 antibodies in blood are not well reported. Second, they provide qualitative results in 15-25
220 minutes compared to the 2.5-3.5 hours with ELISA kits. Moreover, the sample volume required
221 for ICT is lower than for ELISA when using automated processors.
222 Recently, Freire *et al.* compared one ICT (IT LEISH®) and three ELISA (Vircell®, Novalisa®
223 and Ridascreen®) kits in Brazil (5). The overall specificity of these commercial kits (>95% in
224 the whole population) was comparable in our study and in the work by Freire *et al.*, except for
225 Ridascreen® (specificity <85% in Brazil). Conversely, while Ridascreen® displayed the
226 highest sensitivity value in Brazil, we found that this test had the lowest sensitivity among all
227 kits we evaluated. On the other hand, the sensitivity and specificity of the IT LEISH® ICT were
228 similar in both studies, although our values were slightly higher in the whole population. These
229 differences might be explained by antigen variability in parasites from different geographic
230 regions and by cross-reactivity with other endemic pathogens, as highlighted by the World
231 Health Organization (WHO) evaluation of ICT (18). Finally, like Freire *et al.* (5) and other
232 works (6,7) that reported lower performances of serodiagnostic tests in immunocompromised
233 patients, we found a higher number of false-negative results in immunocompromised
234 individuals with VL. These results support the use of molecular assays as an alternative method
235 for VL diagnosis in this group of patients.
236 Regarding WB, this technique is currently used to confirm the positive results obtained by
237 serological screening. Its specificity should be discussed by taking into account the existence
238 of asymptomatic carriers. The Leishmanin skin test (19), blood culture (20), and WB (12) could
239 indeed detect asymptomatic carriers. Here, 10.1% of the control population was positive by

WB. This value is consistent with a larger study performed in Italy showing 7.41% of asymptomatic carriers by WB (21). This finding does not question WB technical specificity because asymptomatic carriers are not false-positive results. Thus, a positive result by WB should be discussed and interpreted on the basis of the biological and clinical data to discriminate between disease and asymptomatic carriage.

Finally, this kits comparison might help to select the most suitable method, using the most appropriate thresholds, and to better understand the limitations of each test.

Acknowledgements

We are grateful to Patricia Gasq, Patrick Lami, Marie-Line Loiry for technical assistance and Nicolas Molinari for help in conception of the study

Financial support

This study received financial support from Santé Publique France (Ministry of Health)

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interests. None of the kits used and evaluated in this study was paid by the manufacturers that had no role in the study design, analysis, decision to publish or preparation of the manuscript.

Author contributions

MFL: study design and article writing

EB: experiments and article writing

PD, BEL, KA, CL, CM, CP: provided serum samples

PB: critical reading and discussion

LL: study design and article writing

JF: statistical analysis

References

1. Ready PD. Epidemiology of visceral leishmaniasis. Clin Epidemiol. 3 mai 2014;6:147-54.
2. van Griensven J, Diro E. Visceral Leishmaniasis: Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. Infect Dis Clin North Am. 2019;33(1):79-99.

3. 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. 13 août 2014;8(8):961-72.

4. Cruz I, Chicharro C, Nieto J, Bailo B, Cañavate C, Figueras M-C, et al. Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J Clin Microbiol. juill 2006;44(7):2343-7.

5. Freire ML, Machado de Assis T, Oliveira E, Moreira de Avelar D, Siqueira IC, Barral A, et al. Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. juill 2019;13(7):e0007484.

6. 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. avr 2008;21(2):334-59, table of contents.

7. Deniau M, Cañavate C, Faraut-Gambarelli F, Marty P. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. Ann Trop Med Parasitol. oct 2003;97 Suppl 1:115-33.

8. Duthie MS, Lison A, Courtenay O. Advances toward Diagnostic Tools for Managing Zoonotic Visceral Leishmaniasis. Trends Parasitol. 2018;34(10):881-90.

9. Antinori S, Calattini S, Longhi E, Bestetti G, Piolini R, Magni C, et al. Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am. 15 juin 2007;44(12):1602-10.

10. 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. sept 2014;52(9):3147-55.

11. Heidari S, Gharechahi J, Mohebali M, Akhoundi B, Mirshahvaladi S, Azarian B, et al. Western Blot Analysis of Leishmania infantum Antigens in Sera of Patients with Visceral Leishmaniasis. Iran J Parasitol. mars 2019;14(1):10-9.

12. 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. déc 1992;47(6):764-71.

13. World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation, éditeurs. Control of the leishmaniases: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22 - 26 March 2010. Geneva: World Health Organization; 2010. 186 p. (WHO technical report series).

14. Kar K. Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol. 1995;21(2):123-52.

15. 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. 20 juin 2014;(6):CD009135.

16. Maia Z, Lírio 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. 31 janv 2012;6(1):e1484.

17. 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.

18. TDR | Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Test Performance [Internet]. WHO. [cité 16 sept 2019]. Disponible sur: https://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/vl-rdt-evaluation/en/

19. Bekele F, Belay T, Zeynudin A, Hailu A. Visceral leishmaniasis in selected communities of Hamar and Banna-Tsamai districts in Lower Omo Valley, South West Ethiopia: Sero-epidemological and Leishmanin Skin Test Surveys. PloS One. 2018;13(5):e0197430.

20. le Fichoux Y, Quaranta JF, Aufeuvre JP, Lelievre A, Marty P, Suffia I, et al. Occurrence of Leishmania infantum parasitemia in asymptomatic blood donors living in an area of endemicity in southern France. J Clin Microbiol. juin 1999;37(6):1953-7.

21. Biglino A, Bolla C, Concialdi E, Trisciuoglio A, Romano A, Ferroglio E. Asymptomatic Leishmania infantum infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. J Clin Microbiol. janv 2010;48(1):131-6.

327 ## Figures and Tables

328

329 **Figure 1. Distribution of anti-*Leishmania infantum* antibody titres for the four ELISA**
330 **assays according to patients' immune status.**

331

332 **Figure 2. Comparison of the ROC curves for the four ELISA assays.**

333

334 **Figure 3. Confirmation of screening tests results by Western Blot.**
335 The asterisk corresponds to the same patient who was found positive with Ridascreen®, IT
336 LEISH® and TruQuick® kits.

337

338 **Table 1. Characteristics of the commercial kits for the serological diagnosis of human**
339 **visceral leishmaniasis.**
340 The asterisk corresponds to the total duration for the analysis of 96 wells.

341

342 **Table 2. Sensitivity, specificity and accuracy of the tested commercial kits.**

343

344 **Table 3. Comparison of false-negative results in patients with visceral leishmaniasis**
345 **according to their immune status.**

346

347 **Table 4. Sensitivity and specificity of the four ELISA assays using the proposed**
348 **thresholds.**

Figure 1. Distribution of anti-*Leishmania infantum* antibody titres for the four ELISA assays according to patients' immune status.

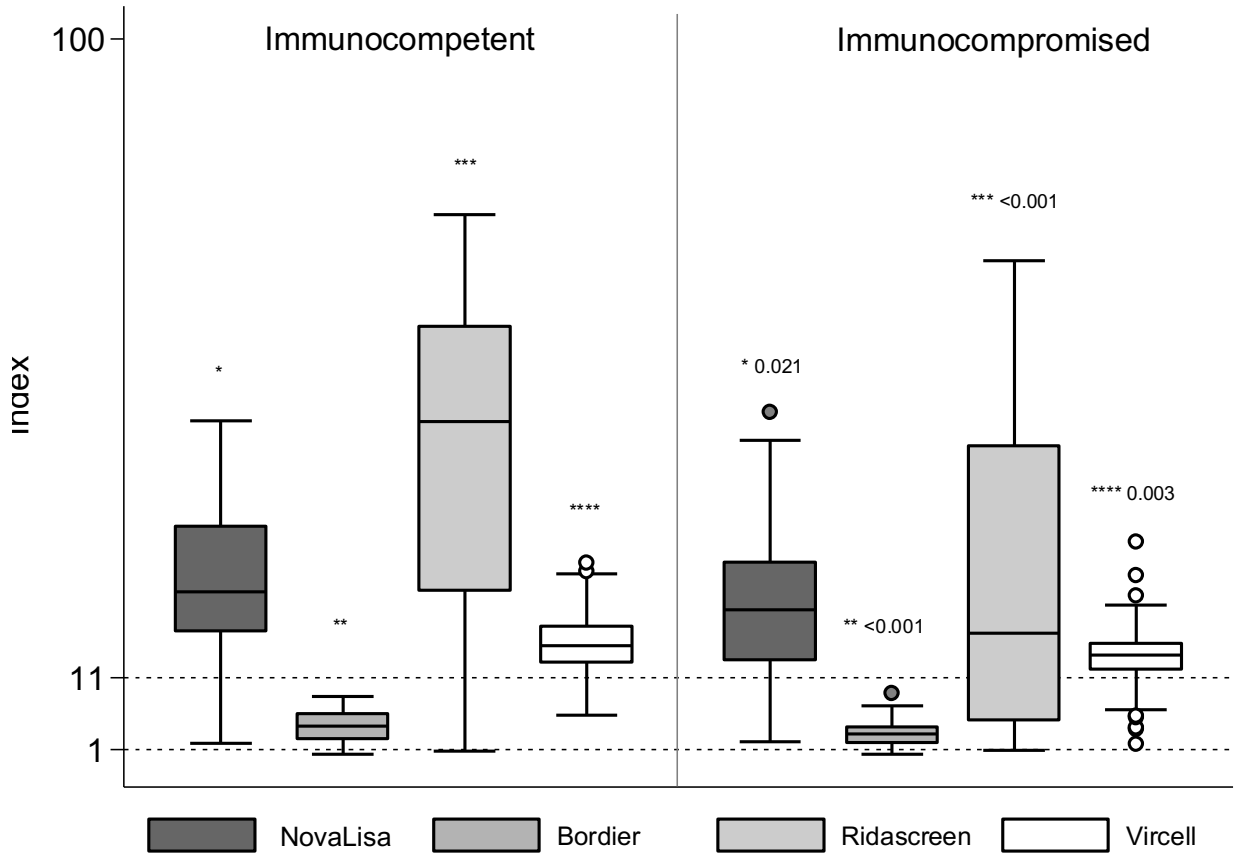
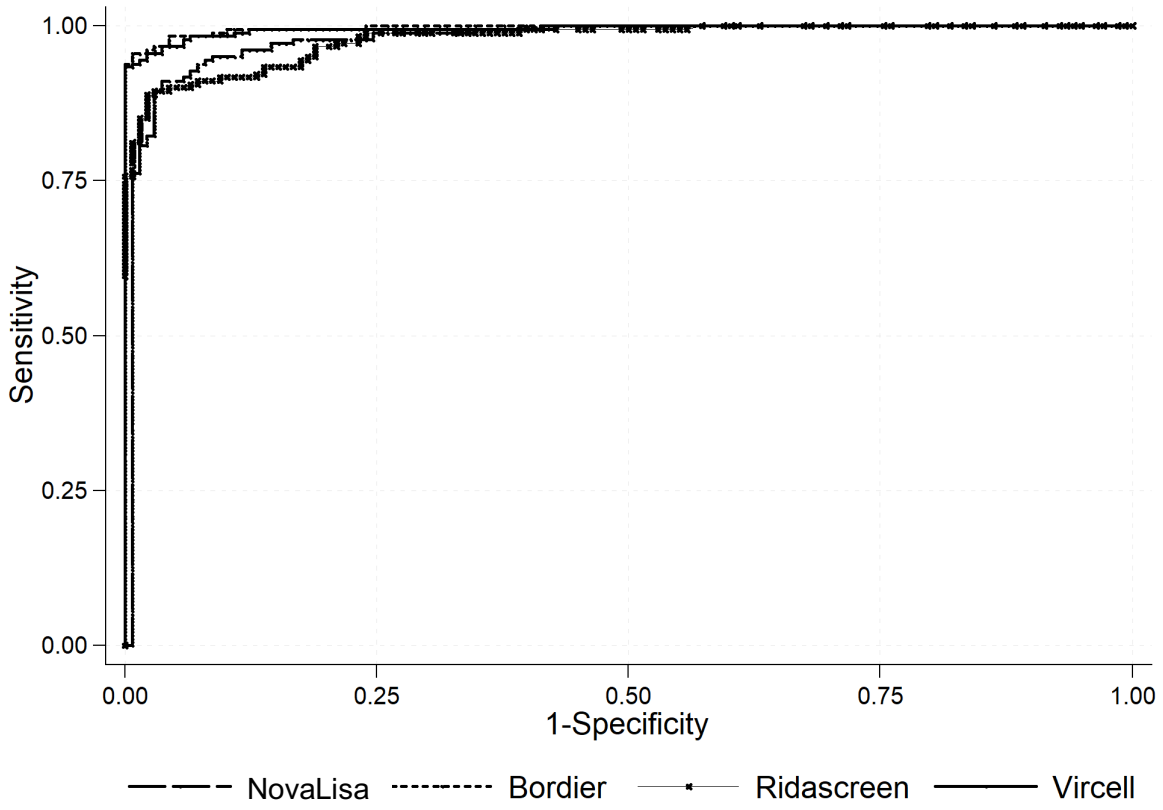


Figure 2. Comparison of the ROC curves for the four ELISA assays.



ELISA kit	AUC [95% CI]	p (AUC comparison)
NOVALISA®	0.9773 [0.9604-0.9942]	0.0197
BORDIER®	0.9965 [0.9931-0.9999]	Reference
RIDASCREEN®	0.9779 [0.9657-0.9901]	0.0013
VIRCELL®	0.9946 [0.9892-1.000]	0.3008

Figure 3. Confirmation of screening tests results by Western Blot.

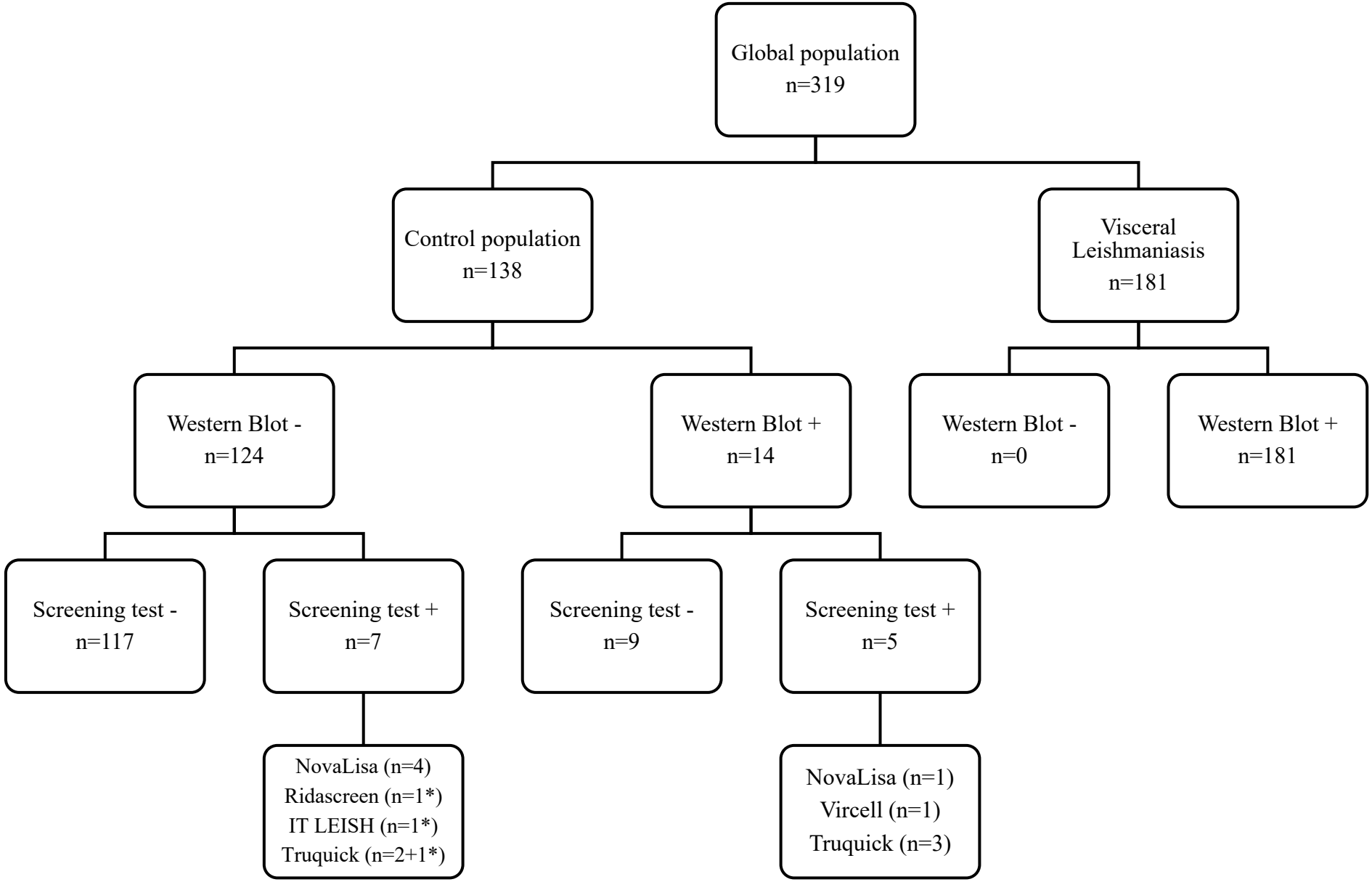


Table 1. Characteristics of the commercial kits for the serological diagnosis of human visceral leishmaniasis.

Commercial kit	Manufacturer	Method	Threshold	Sample type and volume	Time	Antigen
NOVALISA® *Leishmania infantum* IgG	Novatec Immundiagnostic a GMBH	ELISA	Negative: <9 Equivocal: [9;11[Positive: ≥11	Serum 5µL	3.5h*	*L. infantum*
BORDIER® *Leishmania infantum*	Bordier Affinity products SA	ELISA	Negative: <1 Positive: ≥1	Serum 5µL	3.5h*	*L. infantum*
RIDASCREEN® *Leishmania* IgG	R-Biopharm AG	ELISA	Negative : <9 Equivocal: [9;11[Positive: ≥11	Serum 10µL	2.5h*	*L. infantum*
VIRCELL® *Leishmania* IgG/IgM	Vircell S.L.	ELISA	Negative: <9 Equivocal: [9;11[Positive: ≥11	Serum 5µL	2.5h*	*L. infantum*
IT LEISH®	BIO-RAD Laboratories, Inc.	ICT	Positive: Control + IgG bands	Serum/Blood 8-12µL	25min	*L. infantum*
MERIDIAN® TruQuick™ LEISH IgG/IgM	Meridian Bioscience	ICT	Positive: Control + IgG and/or IgM bands	Serum/Blood 40µL	15min	*L. donovani*
***Leishmania* Western blot** IgG	LD BIO Diagnostics	Western Blot	Positive: 14-kD and/or 16-kD band	Serum 25µL	3.5h	*L. infantum*

Table 2. Sensitivity, specificity and accuracy of the tested commercial kits.

Manufacturer	Sensitivity (%) [95%CI]	Specificity (%) [95%CI)	Accuracy (%) [95%CI]	p (accuracy comparison)
NOVALISA®	89.5% [86.1-92.9]	96.4% [94.3-98.4]	92.5% [89.7-95.4]	0.043
BORDIER®	93.4% [90.6-96.1]	100% [100-100]	96.2% [94.1-98.3]	Reference
RIDASCREEN®	80.7% [76.3-85.0]	99,3% [98.3-100.2]	88.7% [85.2-92.2]	<0.001
VIRCELL®	93.9% [91.3-96.5]	99,3% [98.3-100.2]	96.2% [94.1-98.3]	1
IT LEISH®	85.1% [81.2-88.9]	99,3% [98.3-100.2]	91.2% [88.1-94.3]	0.009
TRUQUICK®	90.1% [86.8-93.3]	95,7% [93.4-97.9]	92.5% [89.7-95.4]	0.043

Table 3. Comparison of false-negative results in patients with visceral leishmaniasis according to their immune status.

Manufacturer	Immunocompetent (n=116)	Immunocompromised (n=65)	p
NOVALISA®	7 (6.0%)	12 (18.5%)	0.009
BORDIER®	2 (1.7%)	10 (15.4%)	<0.001
RIDASCREEN®	8 (6.9%)	27 (41.5%)	<0.001
VIRCELL®	1 (0.9%)	10 (15.4%)	<0.001
IT LEISH ®	8 (6.9%)	19 (29.2%)	<0.001
TRUQUICK®	6 (5.2%)	12 (18.5%)	0.004

Table 4. Sensitivity and specificity of the four ELISA assays using the proposed thresholds

ELISA kits	Threshold	Sensitivity (%) [95%CI]	Specificity (%) [95%CI]	p (specificity)
Vircell®	7.686	95.03 [92.6-97.4]	97.83 [96.2-99.4]	0.062
NovaLisa®	5.604		91.30 [88.2-81.88]	<0.001
Ridascreen®	1.491		81.88 [77.6-86.1]	<0.001
Bordier®	0.746		99.28 [98.3-100]	Reference

Conclusion - perspectives

Le diagnostic de la leishmaniose viscérale (LV) nécessite des méthodes fiables et rapides. En plus du diagnostic parasitologique basé sur l'examen direct de moelle osseuse, la culture et la PCR, il est préconisé d'associer un test sérologique (HAS, 2017). Bien que le diagnostic sérologique de la LV, soit largement utilisé, et que de nombreux tests commerciaux soient disponibles, peu études comparatives incluant un grand nombre de patients ont été menées à ce jour.

Cette étude a permis d'évaluer les performances analytiques de tests commerciaux basés sur différentes techniques : ELISA, ICT, WB. Deux populations ont été incluses ; des patients immunocompétents et immunodéprimés atteint de leishmaniose viscérale et dont le diagnostic avait été confirmé par diagnostic parasitologique, et des patients immunocompétents vivants en zone d'endémie et n'ayant jamais présenté de signe clinique de leishmaniose viscérale.

Dans la population globale, deux tests de dépistage ELISA ont montré des performances analytiques significativement supérieures aux autres tests : Bordier® et Vircell®. Parmi les six tests de dépistage utilisés, aucun n'atteignait une sensibilité de 95%, recommandé pour le dépistage de la LV(Boelaert et al., 2014) . Nous avons donc réévalué les seuils de positivité des tests ELISA pour obtenir une sensibilité d'au moins 95% associée à la spécificité la plus élevée. Ainsi, pour les kits Bordier®, Vircell® et Novalisa® nous avons pu proposer de nouveaux seuils d'interprétation tout en conservant une bonne spécificité.

Comme démontré dans d'autres études (Alvar et al., 2008; Deniau et al., 2003; Freire et al., 2019), les tests sérologiques sont moins performants chez les patients immunodéprimés ; et nous avons constaté une fréquence plus élevée de résultats faux négatifs dans cette population de patients atteints de LV.

En ce qui concerne le WB, actuellement utilisée pour confirmer un résultat positif, la sensibilité était de 100% dans notre étude. Quant à sa spécificité, elle doit être discutée en gardant à l'esprit le concept de porteurs asymptomatiques. En effet, dans les zones d'endémie de *L. infantum*, il est bien établi qu'une partie de la population est constituée de porteurs asymptomatiques. Dans notre étude, 10,1% de la population contrôle avait un WB positif. Ce pourcentage est comparable à celui d'une étude menée en Italie qui retrouve 7,41% de western blot positifs chez des porteurs asymptomatiques (Biglino et al., 2010). La question ne porte pas sur la spécificité technique du WB car les porteurs asymptomatiques ne sont, à priori, pas faussement positifs. En effet, le WB étant la technique utilisée en confirmation, il n'existe pas d'autres tests sérologiques permettant de statuer sur sa spécificité chez des

patients asymptomatiques. Pour évaluer la spécificité du WB dans cette population, il serait intéressant de tester des patients n'ayants jamais séjourné en zone d'endémie. Seule cette population permettrait de distinguer un faux positif analytique d'un porteur asymptomatique. Néanmoins, il est actuellement difficile de recruter ce type de population du fait des voyages de plus en plus fréquents, même de courte durée, en zone d'endémie. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester les sérums de patient issus de la population asymptomatique présentant un WB positif par qPCR. Un résultat discordant ne permettrait pas de conclure tandis qu'un résultat positif par détection moléculaire confirmerait cette notion de portage asymptomatique détecté par WB.

Un des biais de l'étude est de n'avoir inclus que des patients immunocompétents dans la population témoin. Or pour mener une étude statistique plus conforme, il aurait été bon d'inclure des patients immunodéprimés dans la population témoin. En effet, cela nous aurait permis d'évaluer les performances des tests (sensibilité, spécificité, et « accuracy ») en fonction du statut immunitaire des patients, comme l'étude de Freire *et al*. Toutefois, il faut garder à l'esprit que cela n'aurait pas changé les résultats de notre étude car, il y a peu de probabilité qu'un patient immunodéprimé sans signe clinique de LV donne un résultat faux positif du fait de la diminution de la synthèse d'anticorps. Toujours dans la population témoin, il aurait été judicieux d'inclure des patients ayant des signes cliniques similaires à la LV (fièvre, asthénie, splénomégalie, pancytopénie …) mais avec un diagnostic autre (ex. hémopathie malignes, histoplasmose…) afin de mieux évaluer la spécificité.

En conclusion, dans notre étude, la technique ELISA reste la méthode la plus performante pour le dépistage sérologique de la LV à condition de bien choisir son test et de revoir les seuils d'interprétation proposés par le fournisseur. Les ICT présentent l'avantage de fournir un résultat rapide, et bien que leur sensibilité soit souvent inférieure à celle des meilleurs tests ELISA, leur précision (« accuracy ») n'est pas significativement différente d'autres tests ELISA. Cette étude présentant une comparaison de tests commerciaux disponibles en France, financée par le Centre National de Référence des Leishmanioses, facilitera le choix technique à effectuer par les biologistes.

Références bibliographiques

Aboudourib M., La leishmaniose viscérale infantile. Thèse de Médecine n°152. Faculté de Médecine et de pharmacie de Marrakech

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE *7*, e35671.

Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.-P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., and Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. Clin. Microbiol. Rev. *21*, 334–359, table of contents.

Antinori, S., Calattini, S., Longhi, E., Bestetti, G., Piolini, R., Magni, C., Orlando, G., Gramiccia, M., Acquaviva, V., Foschi, A., et al. (2007). Clinical use of polymerase chain reaction performed on peripheral blood and bone marrow samples for the diagnosis and monitoring of visceral leishmaniasis in HIV-infected and HIV-uninfected patients: a single-center, 8-year experience in Italy and review of the literature. Clin. Infect. Dis. *44*, 1602–1610.

Aoun, K., Jeddi, F., Amri, F., Ghrab, J., and Bouratbine, A. (2009). Actualités épidémiologiques de la leishmaniose viscérale en Tunisie. /data/revues/0399077X/v39i10/S0399077X09002297/.

Badaro, R., Jones, T.C., Carvalho, E.M., Sampaio, D., Reed, S.G., Barral, A., Teixeira, R., and Johnson, W.D. (1986). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. *154*, 1003–1011.

Biglino, A., Bolla, C., Concialdi, E., Trisciuoglio, A., Romano, A., and Ferroglio, E. (2010). Asymptomatic Leishmania infantum infection in an area of northwestern Italy (Piedmont region) where such infections are traditionally nonendemic. J. Clin. Microbiol. *48*, 131–136.

Boelaert, M., Verdonck, K., Menten, J., Sunyoto, T., van Griensven, J., Chappuis, F., and Rijal, S. (2014). Rapid tests for the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients with suspected disease. Cochrane Database Syst Rev CD009135.

Bogdan, C. (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cell. Microbiol. *10*, 1221–1234.

Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Gonçalves, R.B., Vézilier, F., Petit-Didier, E., Papierok, G., and Lemesre, J.L. (2009). Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAp-MDP vaccinated protected dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. *128*, 71–78.

Bourgeois, N., Lachaud, L., Reynes, J., Rouanet, I., Mahamat, A., and Bastien, P. (2008). Long-term monitoring of visceral leishmaniasis in patients with AIDS: relapse risk factors, value of polymerase chain reaction, and potential impact on secondary prophylaxis. J. Acquir. Immune Defic. Syndr. *48*, 13–19.

Bourgeois, N., Bastien, P., Reynes, J., Makinson, A., Rouanet, I., and Lachaud, L. (2010). “Active chronic visceral leishmaniasis” in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. HIV Med. *11*, 670–673.

Buffet, P.A., Rosenthal, É., Gangneux, J.-P., Lightburne, E., Couppié, P., Morizot, G., Lachaud, L., Marty, P., and Dedet, J.-P. (2011). Traitement des leishmanioses en France : proposition d’un référentiel consensuel. La Presse Médicale *40*, 173–184.

CNRL, 2019 Rapport annuel d’activité, CNRL, 2019.

Cruz, I., Chicharro, C., Nieto, J., Bailo, B., Cañavate, C., Figueras, M.-C., and Alvar, J. (2006). Comparison of new diagnostic tools for management of pediatric Mediterranean visceral leishmaniasis. J. Clin. Microbiol. *44*, 2343–2347.

Cunningham, D.D. (1885). On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil (Calcutta: Printed by the Superintendent of government printing, India).

Deniau, M., Cañavate, C., Faraut-Gambarelli, F., and Marty, P. (2003). The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. Ann Trop Med Parasitol *97 Suppl 1*, 115–133.

Desjeux, P., and Alvar, J. (2003). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol *97 Suppl 1*, 3–15.

Duarte, M.C., Lage, D.P., Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Roatt, B.M., Menezes-Souza, D., Goulart, L.R., Soto, M., Tavares, C.A.P., and Coelho, E.A.F. (2016). Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. *49*, 398–407.

El Alami S. 85 années de leishmaniose au Maroc. Thèse de Medecine n°25/09. Faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat.

Freire, M.L., Machado de Assis, T., Oliveira, E., Moreira de Avelar, D., Siqueira, I.C., Barral, A., Rabello, A., and Cota, G. (2019). Performance of serological tests available in Brazil for the diagnosis of human visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis *13*, e0007484.

Gangneux, J.P. (1999). [Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities]. Presse Med *28*, 2057–2066.

Gradoni, L. (2015). Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. Vet. Parasitol. *208*, 94–100.

HAS, L. (2017). Haute Autorité de santé. 54.

Izri, M.A., Deniau, M., Brière, C., Rivollet, D., Petithory, J.C., Houin, R., and Rousset, J.J. (1996). Leishmaniasis in AIDS patients: results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis. Bull. World Health Organ. *74*, 91–93.

Lachaud, L., Dereure, J., Chabbert, E., Reynes, J., Mauboussin, J.M., Oziol, E., Dedet, J.P., and Bastien, P. (2000). Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-

up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. J. Clin. Microbiol. *38*, 236–240.

Lainson, R., and Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution (Academic Press).

Leishman, W.B. (1903). ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. British Medical Journal *1*, 1252.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, I.J., Lynn, D., et al. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa*. The Journal of Protozoology *27*, 37–58.

Magill, 1995 Epidemiology of the leishmaniases. - PubMed - NCBI.

Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.-P., Xeridat, B., Schleinitz, N., Cuisenier, B., and Dumon, H. (2006). 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. *75*, 858–863.

Maurya, R., Singh, R.K., Kumar, B., Salotra, P., Rai, M., and Sundar, S. (2005). Evaluation of PCR for Diagnosis of Indian Kala-Azar and Assessment of Cure. J Clin Microbiol *43*, 3038–3041.

Meller-Melloul, C., Farnarier, C., Dunan, S., Faugere, B., Franck, J., Mary, C., Bongrand, P., Quilici, M., and Kaplanski, S. (1991). Evidence of subjects sensitized to Leishmania infantum on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. Parasite Immunol. *13*, 531–536.

Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., and Marty, P. (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of Leishmania infantum (L. chagasi) in human. Acta Trop. *119*, 69–75.

Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.-M., and Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. PLoS Negl Trop Dis *6*, e1683.

OMS, 2019 Principaux repères sur la leishmaniose.

Pampiglione, S., Manson-Bahr, P.E., La Placa, M., Borgatti, M.A., and Musumeci, S. (1975). Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *69*, 60–68.

Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., and Antoniades, G. (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. J. Infect. *50*, 53–60.

Passos, S., Carvalho, L.P., Orge, G., Jerônimo, S.M., Bezerra, G., Soto, M., Alonso, C., and Carvalho, E.M. (2005). Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. *12*, 1164–1167.

Riera, C., Fisa, R., Lopez, P., Ribera, E., Carrió, J., Falcó, V., Molina, I., Gállego, M., and Portús, M. (2004). Evaluation of a latex agglutination test (KAtex) for detection of

Leishmania antigen in urine of patients with HIV-Leishmania coinfection: value in diagnosis and post-treatment follow-up. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *23*, 899–904.

Silveira, F.T., Lainson, R., De Souza, A.A.A., Campos, M.B., Carneiro, L.A., Lima, L.V.R., Ramos, P.K.S., de Castro Gomes, C.M., Laurenti, M.D., and Corbett, C.E.P. (2010). Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in Amazonian Brazil. Parasitol. Res. *106*, 377–386.

Singh, N., Kumar, M., and Singh, R.K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med *5*, 485–497.

Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M.K., Goyal, A.K., Mandal, A.K., Voss, A., Hilgard, P., and Murray, H.W. (1998). Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. Lancet *352*, 1821–1823.

ANNEXES

GENERALITES

D'après l'ouvrage « Les leishmanioses » Jean-Pierre Debet, Médecine tropicale, Ellipses AUPELF/UREF.

1. *Leishmania* et leishmanioses

Les leishmanioses sont des parasitoses dont l'agent pathogène est un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*.

1.1 Parasite et cycle de vie

Le cycle de vie du parasite peut se résumer schématiquement à trois éléments : l'agent pathogène, le vecteur et le réservoir (Rioux et al., 1977).

1.1.1 L'agent pathogène : *Leishmania*

Les leishmanies sont des parasites protozoaires flagellés du système réticulo-histiocytaire.
Les lésions cutanées caractéristiques des leishmanioses sont connues depuis le VIIème siècle avant notre ère, mais ce n'est qu'en 1885, que le Colonel D.D. Cunningham, les associe à la présente d'un parasite, qu'il décrit comme une spore appartenant probablement au règne fungique (Cunningham, 1885). En 1900, le médecin-militaire écossais, Sir William Leishman, décrit « des corps de Leishman », apparentés aux trypanosomes, dans des frottis de rate d'un soldat décédé de la « fièvre noire » en Inde (Leishman, 1903). En 1903, le Capitaine Charles Donovan met également en évidence le parasite dans une biopsie de rate (Donovan C. 1903). Par regroupement des observations faites par ces messieurs, Sir Ronald Ross nomme le parasite responsable de la fièvre noire ou Kala-azar, *Leishmania donovani*.
En 1904, Cathoire et Laveran découvrent la présence de leishmanies chez des enfants souffrant d'anémie splénique infantile en Tunisie, et c'est Charles Nicolle qui donne au parasite le nom de *Leishmania infantum*.
Depuis de nombreuses espèces ont été décrites dans d'autres régions du monde, chez d'autres espèces mammifères et sous d'autres formes cliniques (Steverding, 2017).

1.1.1.1 Taxonomie

Selon la classification de Levine (Levine et al., 1980), les Leishmanies se positionnent ainsi dans le règne animal :

- Règne : Protista
- Sous-règne : Protozoa
- Embranchement : Sarcomastigophora
- Sous-embranchement : Mastigophora
- Classe : Zoomastigophorea
- Ordre : Kinetoplastida
- Famille : Trypanosomatidae
- Genre : *Leishmania*

La classification actuelle des Leishmanies reconnaît deux sous-genres selon la localisation du cycle parasitaire dans la partie antérieure ou postérieure de l'intestin du phlébotome (Lainson and Shaw, 1987). On distingue ainsi le sous-genre ***Leishmania***, présent dans l'Ancien et le Nouveau Monde, et le sous-genre ***Viannia***, restreint au Nouveau Monde.

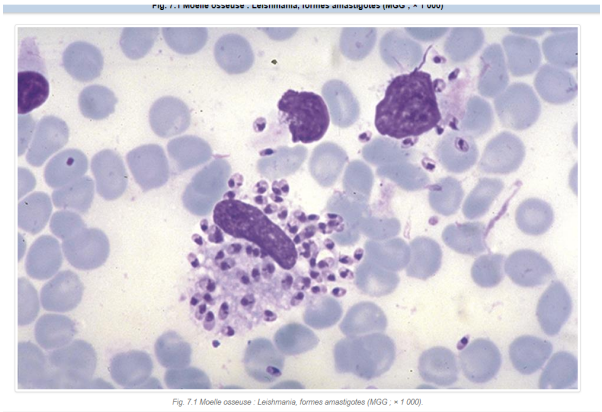
Il existe environ une trentaine d'espèces de *Leishmania* pathogènes pour l'Homme, toutes de morphologie similaire, ce qui ne permet pas de les différencier par l'observation microscopique. Toutefois, on peut distinguer des espèces à tropisme viscérale (*L. donovani* et *L. infantum*) et des espèces dermotropes (pratiquement toutes les autres espèces, notamment *L. major, L. tropica, L. braziliensis* et *L. mexicana*).

A partir des années soixante-dix, l'électrophorèse des iso-enzymes a permis de standardiser l'identification des espèces, en regroupant les souches en zymodèmes selon le profil enzymatique. C'est la technique de référence pour l'identification.

1.1.1.2 Morphologie

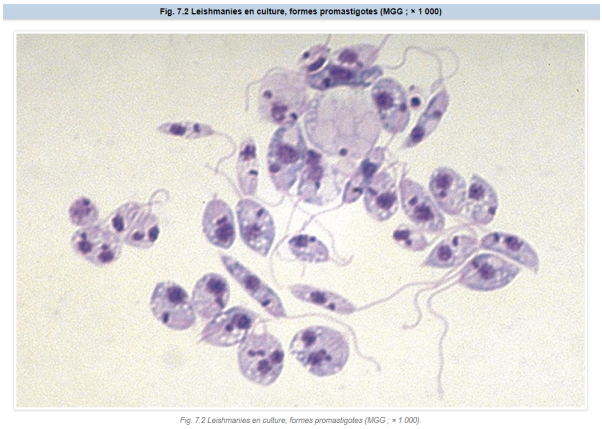
Les leishmanies sont des parasites dimorphiques, ils existent sous deux formes au cours de leur cycle : la forme amastigote et la forme promastigote.

- ✓ La forme **amastigote**, présente chez l'hôte vertébré, est intracellulaire, immobile, sans flagelle extériorisé. Visible au microscope après coloration au May-Grünwald-Giemsa (MGG), elle est ovoïde, mesure de 2 à 6 µm et présente un noyau arrondi et un kinétoplaste en bâtonnet (résidu de flagelle internalisé). Cette forme parasite les cellules du système réticulo-histiocytaire du mammifère (notamment les macrophages), où elle survit au sein de vacuoles parasitophores.



http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/1.html

- ✓ La forme **promastigote**, présente dans l'intestin de l'insecte vecteur, est libre (extracellulaire) et mobile grâce à son flagelle. Après coloration au MGG elle est allongée, mesurant de 10 à 25 µm de longueur, avec un noyau central, un kinétoplaste en position antérieure au noyau et un flagelle libre à l'extrémité antérieure du noyau.



http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/1.html

Notons que les kinétoplastidés sont caractérisés par la présence d'un flagelle et d'un corpuscule extra-nucléaire appelé kinétoplaste, correspondant à l'unique ADN mitochondrial.

1.1.2 Le vecteur : le Phlébotome

La leishmaniose est transmise de vertébrés à vertébrés par un petit moucheron hématophage : le phlébotome. Il s'agit d'un arthropode diptère du sous-ordre des Nématocères, de la famille des Psychodidae, et de la sous-famille des Phlebotominae. Il mesure entre 1,5 et 4 mm, de couleur jaune ou beige, au corps et aux ailes velus.

http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/leishmanioses/site/html/1.html

Son gîte est constitué par les biotopes humides et riches en matières organiques (trous d'arbres, anfractuosités de murs, terriers de rongeurs). Il se nourri par piqûre de mammifères, essentiellement le soir et la nuit par temps calme, mais seule la femelle hématophage assure la transmission de la leishmaniose.

De très nombreuses espèces de Phlébotomes existent dans le monde (environ 700), cependant seul les genres *Phlebotomus* (Ancien Monde) et *Lutzomia* (Nouveau Monde) sont impliqués dans l'épidémiologie des leishmanioses.

Présents toute l'année en zone intertropicale, les phlébotomes apparaissent seulement l'été en région tempérée (notamment dans le Sud de la France – méditerranée) conférant à la maladie un caractère saisonnier.

1.1.3 Le réservoir

Les réservoirs naturels des *Leishmania* sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes-mononucléés.

Les mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres : carnivores, rongeurs, marsupiaux, édentés, primates,… ; dans ce cas, la leishmaniose est dite **zoonotique**, et peut infecter accidentellement l'homme (zooanthroponotique).

Lorsque l'Homme est l'unique réservoir du parasite, elle est dite **anthroponotique.**

Pas moins de 62 espèces de mammifères (37 dans l'Ancien Monde et 25 dans le Nouveau Monde) réparties en 21 familles et 7 ordres sont des réservoirs de leishmanioses. Chaque espèce de leishmanioses possède un ou plusieurs réservoirs spécifiques. Les hôtes réservoirs

pouvant être malades ou porteurs sains, assurant ainsi la survie du parasite et le renouvellement de son cycle.

L'homme est l'unique réservoir de la leishmaniose viscérale à *L. donovani* et de la leishmaniose cutanée à *L. tropica*. Les rongeurs sont les réservoirs des leishmanioses cutanées de l'Ancien Monde et du Nouveau Monde. Le chien et d'autres canidés sauvages (renard) assurent le maintien de la leishmaniose viscérale à *L. infantum* dans l'Ancien Monde et le Nouveau Monde. En méditerranée, il représente le principal réservoir de la leishmaniose viscérale, avec près de 30 000 cas par an chez le chien dans le sud de la France (CNR Leishmaniose – Montpellier).

1.1.4 Cycle biologique et transmission

1.1.4.1 Chez le vecteur :

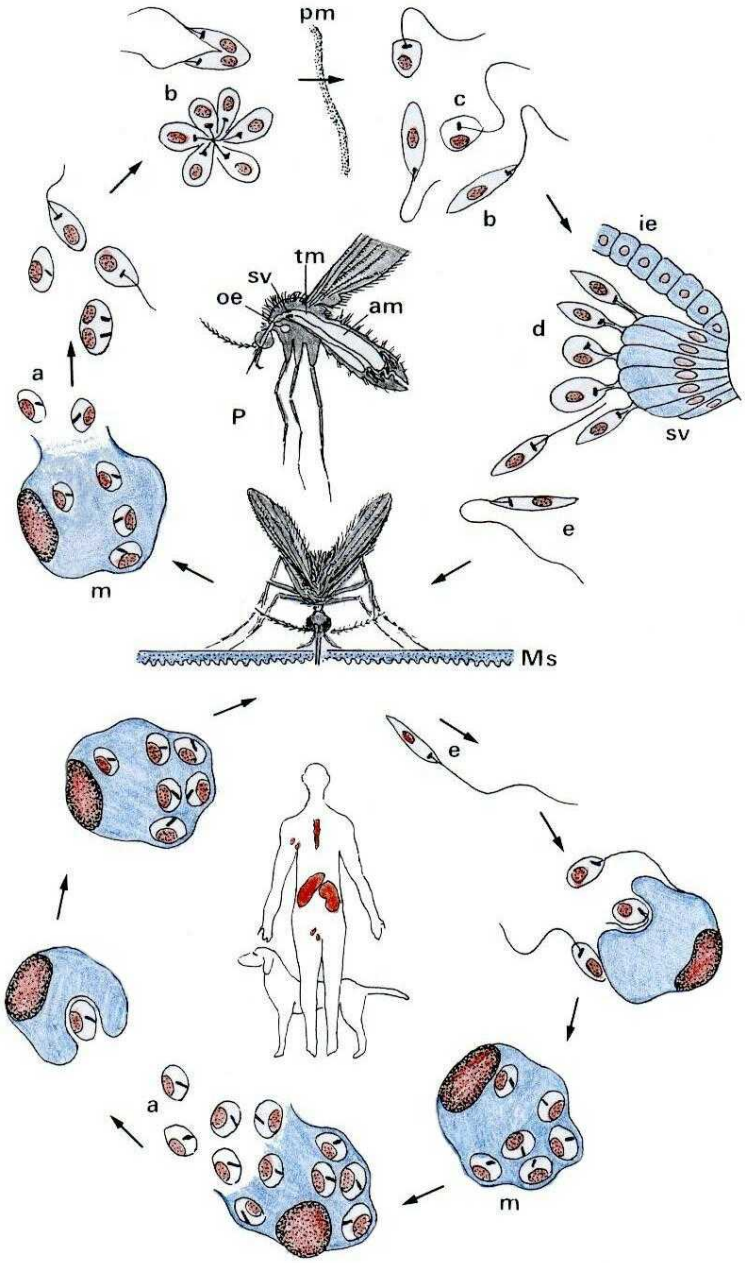
Lors de son repas sanguin, la femelle ingère les formes amastigotes du parasite, présentent dans les macrophages de l'hôte vertébré. Elles se transforment, dans l'intestin moyen, en promastigotes procycliques dans les heures qui suivent, en fonction du pH et de la température. Ces promastigotes procycliques se multiplient par division binaire dans l'intestin du phlébotome, puis se fixent aux villosités de l'épithélium de la muqueuse intestinale et migrent vers la partie antérieure du tube digestif, où a lieu la transformation en formes virulentes dénommées **promastigotes métacycliques** infectants (qui a une paroi plus épaisse et a perdu sa capacité à se multiplier). Ces dernières sont régurgitées lors du repas sanguin suivant dans le derme d'un hôte favorable.

1.1.4.2 Chez l'hôte :

L'inoculation intradermique de promastigotes métacycliques induit, au site même de la piqûre, une lésion qui passe généralement inaperçue chez l'Homme et dont le devenir dépend du tropisme cutané, muqueux ou viscéral des différentes espèces de Leishmania. La piqûre est souvent douloureuse.

Les leishmanies sont des parasites intracellulaires du système des phagocytes mononucléés, notamment les macrophages et les cellules dendritiques. Dès la pénétration intracellulaire, les formes promastigotes métacycliques sont phagocytées et se transforment en formes amastigotes, en raison du pH acide (<5) et de la température élevée (>35°C). Dans le macrophage, les amastigotes se multiplient par division binaire et entraînent la rupture de la

cellule hôte ou l'exclusion de la vacuole parasitophore, libérant ainsi de nombreux amastigotes qui infecteront de nouvelles cellules.



CNR *Leishmania* – CHU Montpellier

1.1.4.3 Physiopathologie : relation hôte vecteur

La salive du phlébotome favorise les premières étapes de l'infection car elle contient des substances pharmacologiques actives qui induisent vasodilatation et immunodépression.

L'interaction primaire des leishmanies et des macrophages repose sur la reconnaissance, sur la face externe du parasite, de molécules de liaison par divers récepteurs présents sur la membrane des macrophages. L'infection dépend d'une phagocytose rapide des promastigotes

et de leur transformation en amastigotes qui, dans une vacuole parasitophore, résistent aux mécanismes de défense cellulaire. Le parasitisme entraîne dans le macrophage une baisse des capacités de production de dérivés oxygénés et nitrogénés, complétant ainsi les mécanismes d'échappement des leishmanies à la digestion cellulaire. Les phénomènes de coopération cellulaire entre macrophages et lymphocytes T CD4 et T CD8 jouent un rôle important dans l'évolution de la maladie. Dans un bon nombre de cas, l'infection reste asymptomatique mais des amastigotes intracellulaires peuvent rester quiescents des années, expliquant les leishmanioses opportunistes de l'immunodéprimé. Lorsque la multiplication intracellulaire reste localisée aux macrophages et aux cellules dendritiques du site d'inoculation, les réactions cellulaires générées et les diverses cytokines produites entraînent le développement d'une lésion cutanée localisée. Les parasites peuvent également être transportés aux ganglions lymphatiques, diffusant à d'autres sites cutanés comme dans la leishmaniose cutanée diffuse, ou aux muqueuses de la face comme dans la leishmaniose cutanéomuqueuse. Dans d'autres cas, les parasites s'étendent à tous les organes du système des phagocytes mononucléés, provoquant la leishmaniose viscérale. Dans cette forme, les organes le plus couramment atteints sont la rate (splénomégalie), le foie, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (pancytopénie).

1.1.4.4 Transmission

La transmission vectorielle est le mode de contamination principal, la présence du phlébotome conditionnant la répartition de la maladie. Il existe également une transmission par échange de seringues chez les toxicomanes (Magill, 1995). Les transmissions transfusionnelles et congénitales restent exceptionnelles.

1.2 Leishmanioses : formes cliniques et traitements

On parle de « leishmanioses », car chez l'homme, elles se présentent sous plusieurs formes cliniques : les leishmanioses cutanées (plus fréquentes), les leishmanioses cutanéo-muqueuses, et les leishmanioses viscérales (plus sévères). Cette diversité de manifestations cliniques dépend principalement du tropisme de l'espèce de *Leishmania* impliquée et à un moindre degré du patient lui-même (dissémination du parasite dans l'organisme de l'hôte et type de réponse induite).

1.2.1 Leishmanioses cutanées

Les leishmanioses cutanées correspondent à des atteintes exclusives de la peau, sans extension aux organes profonds ni aux muqueuses.

1.2.1.1 Leishmanioses cutanées localisées

C'est le classique bouton d'Orient ou autres dénominations en Afrique du Nord et Asie méridionale, le pian-bois en Guyane, l'uta dans les vallées andines, l'ulcère des chicleros en Amérique centrale.

Les espèces dermotropes sont nombreuses. Toutes les espèces anthropophiles de Leishmania peuvent être responsables de leishmaniose cutanée, y compris les espèces habituellement viscérotropes comme *L. infantum*.

La période d'incubation varie entre 1 et 4 mois. Les lésions siègent le plus souvent sur les parties découvertes et exposées à la piqûre des phlébotomes (visage, mains et avant-bras, membres inférieurs). Elles débutent par une petite papule inflammatoire ou vésiculaire qui augmente régulièrement de taille.

À la phase d'état, la lésion leishmanienne est bien circonscrite. Elle mesure entre un demi et une dizaine de centimètres de diamètre et a une forme arrondie ou ovale, régulière. Elle est indolore. Le nombre de lésions est variable et dépend du nombre de piqûres infectantes. La lésion de type ulcérée est la plus fréquemment rencontrée, quelle que soit l'espèce du parasite en cause. L'ulcération centrale, à fond irrégulier, est bordée par un bourrelet périphérique, inflammatoire, rouge ou hyper pigmenté sur peau noire : c'est la zone active de la lésion, riche en macrophages parasités, sur laquelle doit porter le prélèvement destiné au diagnostic parasitologique. L'ulcération est recouverte d'une croûte plus ou moins épaisse.

Des nodules sous-cutanés satellites sont parfois associés. Ils contiennent des parasites et témoignent de la diffusion de l'infection leishmanienne par voie lymphatique.

La lésion de leishmaniose cutanée évolue de façon torpide durant plusieurs mois.

Une surinfection bactérienne secondaire est possible, qui rend le diagnostic parasitologique aléatoire. La lésion finit cependant par guérir spontanément, en laissant une cicatrice indélébile.

1.2.1.2 Leishmanioses cutanées diffuses

Les leishmanioses cutanées diffuses sont peu fréquentes, elles sont essentiellement dues à *L. amazonensis* en Amérique du Sud et *L. aethiopica* en Afrique de l'Est.

La principale lésion est un nodule non ulcéré de petite taille, puis les nodules deviennent très nombreux et disséminés sur l'ensemble du corps. Cette forme de leishmaniose est rebelle aux antileishmaniens classiques.

1.2.2 Leishmanioses cutanéomuqueuses

Les leishmanioses cutanéomuqueuses sont surtout le fait de *L. braziliensis*.
Cette affection évolue en deux temps, la lésion cutanée initiale pouvant être ultérieurement suivie par une atteinte muqueuse secondaire, après une phase quiescente qui peut être très longue. L'atteinte muqueuse, lorsqu'elle se produit, débute à la muqueuse nasale, rapidement envahie et détruite. La perforation qui en résulte est considérée comme un symptôme quasi pathognomonique de leishmaniose cutanéomuqueuse. L'extension peut ensuite se faire au niveau de la muqueuse buccale et du larynx. Cette forme clinique peut aboutir à de spectaculaires et gravissimes destructions du massif facial (espundia).

1.2.3 Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale, décrite en Inde sous le nom de kala-azar ou fièvre noire en sanscrit à la fin du XIXème siècle, présente une distribution géographique très large, allant de la Chine à l'Amérique du Sud. Les grands foyers endémiques sont représentés par les foyers chinois, indien, centre-asiatique, est-africain, méditerranéen et sud-américain.
Deux espèces sont responsables de la leishmaniose viscérale : *L. donovani*, espèce anthroponotique, dans les foyers indiens et est-africain, et *L. infantum*, (également appelé *Leishmania chagasi* en Amérique latine) espèce zoonotique, dans les foyers centre-asiatique, méditerranéen et américain. Quel que soit l'espèce en cause, la leishmaniose viscérale en mortelle en l'absence de traitement.
La prépondérance infantile historique, qui avait donné le nom d'espèce *infantum*, n'existe plus, notamment en France. En revanche, le caractère **opportuniste** de la maladie a été mise en évidence chez les patients VIH, mais également chez les greffés d'organes. Le nombre de cas de leishmanioses coinfectées avec le VIH, particulièrement dans la forme viscérale, a augmenté dans les années quatre-vingt-dix avant l'avènement de la trithérapie antirétrovirale. Les cas de coinfection surviennent chez des adultes jeunes et 70 % d'entre eux sont toxicomanes. Le plus souvent, la coinfection est corrélée au taux des CD4 (90 % de ces

malades ont moins de 200 CD4/mm3). Par ailleurs, les cas après greffe d'organe sont en augmentation depuis une quinzaine d'années.

L'incubation est d'environ 3 à 6 mois mais peut atteindre plusieurs années.

L'infection peut rester asymptomatique dans de nombreux cas. En effet, nombres de travaux publiés depuis les années 1970 indiquent que les formes asymptomatiques seraient la partie immergée de l'iceberg, bien plus fréquente. (Pampiglione et al., 1975) (Badaro et al., 1986) (Meller-Melloul et al., 1991) (Michel et al., 2011). Dans le bassin méditerranéen le portage asymptomatique de *L. infantum* représente entre 0.5 et 58% des individus (Papadopoulou et al., 2005) (Mary et al., 2006) contre 0.05 à 73.4% en Amérique du sud (Passos et al., 2005) (Silveira et al., 2010). La proportion de porteurs asymptomatique dépend donc des zones géographiques considérées mais aussi des tests de détection utilisés.

1.2.3.1 Leishmania infantum

Le tableau typique comprend un trépied symptomatique :

- ✓ Fièvre, qui est le signe clinique le plus précoce et le plus constant. Cette fièvre est dite « folle », irrégulière dans la journée et d'un jour à l'autre ;
- ✓ Pâleur « cireuse », témoin de l'anémie ;
- ✓ Amaigrissement
- ✓ Splénomégalie, qui peut parfois dépasser l'ombilic.

L'hépatomégalie est moins fréquente et les adénopathies sont rares.

D'autres tableaux dissociés, paucisymptomatiques chez l'adulte ou avec des localisations inhabituelles (digestives notamment chez l'enfant ou chez le patient immunodéprimé, cutanées, muqueuses, pleuropulmonaires).

Le diagnostic différentiel se pose principalement avec les hémopathies.

1.2.3.2 Leishmania donovani

Dans la leishmaniose viscérale à anthroponotique, l'expression clinique et l'évolution diffèrent par une plus grande fréquence d'adénopathies et surtout l'existence de signes cutanés : pigmentation bistre plus marquée en zones découvertes, d'où le terme « Kala-azar » qui siginifie littéralement fièvre noire, maculopapules hypo- ou hyperpigmentées, nodules dermiques. Ces deux derniers types de lésions peuvent apparaître au cours de la maladie ou quelques mois ou années après la guérison clinique apparente.

Quelle que soit l'espèce impliquée, la mort survient le plus souvent par infection intercurrente ou hémorragie. Lorsque le traitement est institué suffisamment tôt, l'évolution est favorable et conduit à la guérison clinique, mais des parasites peuvent rester à l'état quiescent dans certaines cellules de l'organisme. Après guérison, les parasites persistent durablement dans l'organisme contribuant au portage asymptomatique des leishmanies (Bogdan, 2008).

1.2.4 Traitement et prévention

La stratégie thérapeutique repose sur l'emploi de médicament de maniement difficile, présentant des effets indésirables importants, des traitements contraignants de longue durée et un coût élevé difficilement accessible pour les patients les plus démunis. De plus, l'apparition de résistance aux molécules complique encore plus leur usage. Il n'existe aucun schéma thérapeutique optimal et il convient d'adapter le traitement à chaque patient (Gangneux, 1999) (Singh et al., 2012).

Le traitement doit être au mieux leishmanicide sur les formes amastigotes, mais doit également avoir une bonne diffusion dans les organes cibles, pour les atteintes viscérales, et un bon profil de tolérance. De plus ces pathologies étant principalement présente dans des pays défavorisés, les molécules peu coûteuses sont à privilégier.

1.2.4.1 Molécules disponibles

1.2.4.1.1 Antimoniés pentavalents

L'efficacité des antimoniés dans le traitement des leishmanioses cutanée et viscérale est confirmée par près d'un siècle d'utilisation. Les produits disponibles sont l'antimoniate de méglumine (Glucantime®) en France et le stibogluconate de sodium (Pentostam®) dans les pays anglo-saxons. Le traitement se prescrit par voie intramusculaire, intraveineuse ou en intralésionnel (formes cutanées). Dans les leishmanioses viscérales, la posologie est de 20 mg/kg par jour de dérivé pentavalent d'antimoine pendant 4 semaines. En raison de sa toxicité cardiaque (conduction ventriculaire), rénale et pancréatique, ce traitement, peu onéreux par lui-même, impose un suivi biologique et clinique étroit. C'est le traitement de première intention dans les zones d'endémie à faibles revenus. Malheureusement, en Inde, les résistances aux antimoniés sont de plus en plus fréquentes (Gangneux, 1999).

1.2.4.1.2 Amphotéricine B liposomale

L'amphotéricine, employée sous sa formulation liposomale (Ambisome®), a l'AMM pour la leishmaniose viscérale, avec une efficacité accrue dans la leishmaniose viscérale du sujet immunocompétent et immunodéprimé, ou en cas de résistance aux dérivées antimoniés pentavalents. Le protocole proposé chez le patient immunocompétent est une injection quotidienne de 3 mg/kg pendant 5 jours, plus une injection à même dose au 10e jour (dose totale : 18 mg/kg) (Gangneux, 1999). Une dose cumulée plus élevée est sans doute nécessaire chez l'immunodéprimé.

1.2.4.1.3 Pentamidine

Seul l'iséthionate de pentamidine, commercialisé sous le nom de Pentacarinat®, est disponible. Il est aujourd'hui surtout utilisé comme médicament de première intention dans le traitement de certaines formes de leishmaniose cutanée en cure courte. Il s'administre en milieu hospitalier, par voie parentérale à la dose de 4 mg/kg. La pentamidine peut induire des effets secondaires immédiats, de type allergique ou local, surtout en cas de perfusion rapide. Les effets toxiques survenant au cours d'une série d'injections sont dépendants de la dose et peuvent atteindre les muscles, le rein, les lignées sanguines, le pancréas et entraîner des diabètes insulinodépendants. Du fait d'effets indésirables dose-dépendants, il n'y a pas d'utilisation dans LV car dose nécessaire serait trop importante.

1.2.4.1.4 Miltéfosine

La miltéfosine (Impavido®) est le premier médicament oral disponible pour le traitement de la leishmaniose viscérale et cutanée. Il est efficace et moins toxique que la pentamidine ou les antimoniés. C'est une autre solution à la chimiorésistance, bien que la molécule soit abortive et tératogène, imposant une contraception efficace pendant traitement et 2 mois après arrêt (car la demi-vie est longue) mais restreignant son utilisation en zone endémie où la contraception peut-être une barrière culturelle (Sundar et al., 1998). La dose recommandée est de 2,5 mg/kg par jour. La dose journalière totale maximum est de 150 mg. En France, il est possible de l'obtenir sous autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU).

1.2.4.1.5 Autres antileishmaniens

L'aminosidine sulfate (Gabbriomycin®), ou paromomycine®, a une efficacité démontrée dans la leishmaniose viscérale à *L. donovani* en Inde (par voie intramusculaire et en association aux

dérivés antimoniés ou miltéfosine) et dans la leishmaniose cutanée localisée à *L. major* (sous forme topique, mais non disponible en France). Elle présente quand même une toxicité rénale et chochléo-vestibulaire.

L'atovaquone et des triazolés, seuls ou associés à des antimoniés, font l'objet de quelques essais limités.

L'allopurinol, le métronidazole ou les dérivés azolés antifongiques inhibant la synthèse d'ergostérol chez les leishmanies ont montré une efficacité variable (Gangneux, 1999).

1.2.4.2 Indications thérapeutiques

Les principales indications thérapeutiques sont présentées dans un référentiel français publié en 2011(Buffet et al., 2011).

1.2.4.2.1 Leishmaniose viscérale

Le traitement de première intention est l'Amphotéricine B sous sa forme liposomale (Ambisome®) chez l'immunocompétent (20 mg/kg cumulés) comme chez l'immunodéprimé (30–40 mg/kg cumulés). Les antimoniés pentavalents sont une bonne alternative mais nécessitent un nombre beaucoup plus élevé d'injections (vingt-huit) et sont associés à un nombre plus élevé d'effets indésirables.

Les récidives sont exceptionnelles chez l'immunocompétent. En revanche, chez les patients coinfectés par le VIH, la guérison est souvent incomplète et les récidives fréquentes.

Une prophylaxie secondaire par Amphotéricine B liposomale, Pentamidine ou Antimoniate de méglumine est proposée aux patients fortement immunodéprimés, et maintenue 6 mois après restauration immunitaire.

1.2.4.2.2 Leishmaniose cutanée

Le choix thérapeutique se fera en fonction de l'espèce de *Leishmania* identifiée, du nombre de lésions et de leurs localisations. Toute fois l'abstention thérapeutique se justifie dans certaines formes bénignes à *L. major* de l'Ancien Monde.

Le traitement local est indiqué en cas de lésion unique (ou peu nombreuses), sans diffusion lymphangitique, siégeant en dehors de zones péri-orificielles. Les infiltrations péri-lésionnelles d'antimoniés pentavalents associées à une cryothérapie superficielle représentent le traitement le plus efficace (une à trois infiltrations, une fois par semaine). La voie parentérale (par un antimonié ou par la pentamidine) est choisie lorsque la leishmaniose

cutanée récidive, en cas de diffusion lymphangitique et dans toutes les formes à *L. guyanensis* et *L. braziliensis* (par exemple, pentamidine en traitement court dans les leishmanioses cutanées de Guyane française à *L. guyanensis*) ou en cas de localisations multiples.

1.2.4.2.3 Leishmaniose cutanéomuqueuse

La lésion cutanée primaire est traitée par les antimoniés pentavalents pendant 20 jours pour éviter la diffusion des parasites vers les muqueuses faciales. Le traitement des atteintes muqueuses est d'autant plus efficace qu'il est réalisé précocement et dure 28 jours, limitant ainsi l'extension des mutilations.

1.2.5 Prévention

La lutte contre les réservoirs sauvages est difficile et les campagnes d'élimination des chiens porteurs n'ont qu'une efficacité transitoire.

Les mesures prophylactiques individuelles sont destinées à éviter la piqûre des phlébotomes. Elles consistent en des pulvérisations domiciliaires et péridomiciliaires de pyréthrinoïdes de synthèse et en l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes. Le port de colliers insecticides chez le chien dans les foyers de leishmaniose viscérale à *L. infantum* est recommandé.

La production d'un vaccin reste un challenge à l'heure actuelle. Des essais sont en cours pour des vaccins dirigés contre des fragments protéiques de *L. donovani* ou *L. infantum* (Duarte et al., 2016). Ces vaccins sont produits à partir de protéines de surface ou de protéines excrétées par le parasite, comme la GP63 ou la GP46 (Duarte et al., 2016).

Un vaccin canin utilisant des fragments de GP63 est utilisé au Brésil depuis 2004 (Leishmune®). En France, un vaccin canin ciblant la GP46 de *L. infantum* a été mis au point à l'IRD de Montpellier et est commercialisé sous l'appellation CaniLeish® depuis 2011 en Europe (Bourdoiseau et al., 2009). L'intérêt de ces vaccins réside dans l'induction d'une réponse Th1 avec production de NO par le parasite après la vaccination, ce qui permet une élimination rapide de l'infection (Moreno et al., 2012) (Gradoni, 2015).

1.3 Répartition géographique - Epidémiologie – données CNRL

1.3.1 Epidémiologie mondiale

Très largement répandues sur Terre, les leishmanioses sont des parasitoses des zones intertropicales (sauf l'Océanie) et tempérées chaudes, présente dans 88 pays (16 pays industrialisés, 72 pays en voie de développement) répartis en cinq foyers : méditerranéen, chinois, indien, africain et américain (Desjeux and Alvar, 2003).

En 2019, l'OMS estime la prévalence mondiale de la maladie à **12 millions de cas** et l'incidence annuelle mondiale à **2 millions**, soit **1,5 million** de leishmanioses cutanées dont 90% en Algérie, Afghanistan, Arabie saoudite, Brésil, Iran, Pérou, Syrie, et **500 000** leishmanioses viscérales dont 90% au Bangladesh, Brésil, Inde, Népal et Soudan. Il y aurait chaque année **30000** décès. De plus 350 millions de personnes sont exposées au risque de contamination. (OMS, 2019) (Alvar et al., 2012)

Ces chiffres restent stables malgré les efforts fait pour réduire la transmission de la maladie.

1.3.2 Epidémiologie des leishmanioses viscérales en France

La seule espèce observée en France est *Leishmania infantum*, dont le réservoir principal est le chien. Et chez l'homme la leishmaniose viscérale est l'expression clinique dominante.

L'incidence annuelle des leishmanioses autochtones métropolitaines déclarées en France au CNRL reste stable. En 2018, 15 cas de leishmanioses autochtones ont été déclarés, dont dix leishmanioses viscérales, quatre cutanées et une muqueuse.

En revanche le nombre de cas importés est beaucoup plus élevé, avec 148 cas déclarés dont cinq leishmanioses viscérales, 143 leishmanioses cutanée, et aucune leishmaniose cutanéomuqueuse.

Ces données sont modestes comparées au 300 000 cas de leishmaniose viscérales en Inde et aux 100 000 morts au Soudan à la fin du XXème siècle.

Références bibliographiques

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and WHO Leishmaniasis Control Team (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE *7*, e35671.

Badaro, R., Jones, T.C., Carvalho, E.M., Sampaio, D., Reed, S.G., Barral, A., Teixeira, R., and Johnson, W.D. (1986). New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. J. Infect. Dis. *154*, 1003–1011.

Bogdan, C. (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. Cell. Microbiol. *10*, 1221–1234.

Bourdoiseau, G., Hugnet, C., Gonçalves, R.B., Vézilier, F., Petit-Didier, E., Papierok, G., and Lemesre, J.L. (2009). Effective humoral and cellular immunoprotective responses in Li ESAp-MDP vaccinated protected dogs. Vet. Immunol. Immunopathol. *128*, 71–78.

Buffet, P.A., Rosenthal, É., Gangneux, J.-P., Lightburne, E., Couppié, P., Morizot, G., Lachaud, L., Marty, P., and Dedet, J.-P. (2011). Traitement des leishmanioses en France : proposition d'un référentiel consensuel. La Presse Médicale *40*, 173–184.

Cunningham, D.D. (1885). On the presence of peculiar parasitic organisms in the tissue of a specimen of Delhi boil (Calcutta: Printed by the Superintendent of government printing, India).

Desjeux, P., and Alvar, J. (2003). Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. Ann Trop Med Parasitol *97 Suppl 1*, 3–15.

Duarte, M.C., Lage, D.P., Martins, V.T., Chávez-Fumagalli, M.A., Roatt, B.M., Menezes-Souza, D., Goulart, L.R., Soto, M., Tavares, C.A.P., and Coelho, E.A.F. (2016). Recent updates and perspectives on approaches for the development of vaccines against visceral leishmaniasis. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. *49*, 398–407.

Gangneux, J.P. (1999). [Treatment of visceral leishmaniasis: recent modalities]. Presse Med *28*, 2057–2066.

Gradoni, L. (2015). Canine Leishmania vaccines: still a long way to go. Vet. Parasitol. *208*, 94–100.

Jean-Charles, L. (2017). Haute Autorité de santé. 54.

Lainson, R., and Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution (Academic Press).

Leishman, W.B. (1903). ON THE POSSIBILITY OF THE OCCURRENCE OF TRYPANOSOMIASIS IN INDIA. British Medical Journal *1*, 1252.

Levine, N.D., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich, A.R., Lom, I.J., Lynn, D., et al. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa*. The Journal of Protozoology *27*, 37–58.

Magill, 1995 Epidemiology of the leishmaniases. - PubMed - NCBI.

Mary, C., Faraut, F., Drogoul, M.-P., Xeridat, B., Schleinitz, N., Cuisenier, B., and Dumon, H. (2006). 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. *75*, 858–863.

Meller-Melloul, C., Farnarier, C., Dunan, S., Faugere, B., Franck, J., Mary, C., Bongrand, P., Quilici, M., and Kaplanski, S. (1991). Evidence of subjects sensitized to Leishmania infantum on the French Mediterranean coast: differences in gamma interferon production between this population and visceral leishmaniasis patients. Parasite Immunol. *13*, 531–536.

Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., and Marty, P. (2011). Importance of worldwide asymptomatic carriers of Leishmania infantum (L. chagasi) in human. Acta Trop. *119*, 69–75.

Moreno, J., Vouldoukis, I., Martin, V., McGahie, D., Cuisinier, A.-M., and Gueguen, S. (2012). Use of a LiESP/QA-21 vaccine (CaniLeish) stimulates an appropriate Th1-dominated cell-mediated immune response in dogs. PLoS Negl Trop Dis *6*, e1683.

OMS, 2019 Principaux repères sur la leishmaniose.

Palatnik-de-Sousa, 2011 One Health: The global challenge of epidemic and endemic leishmaniasis | Parasites & Vectors | Full Text.

Pampiglione, S., Manson-Bahr, P.E., La Placa, M., Borgatti, M.A., and Musumeci, S. (1975). Studies in Mediterranean leishmaniasis. 3. The leishmanin skin test in kala-azar. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. *69*, 60–68.

Papadopoulou, C., Kostoula, A., Dimitriou, D., Panagiou, A., Bobojianni, C., and Antoniades, G. (2005). Human and canine leishmaniasis in asymptomatic and symptomatic population in Northwestern Greece. J. Infect. *50*, 53–60.

Passos, S., Carvalho, L.P., Orge, G., Jerônimo, S.M., Bezerra, G., Soto, M., Alonso, C., and Carvalho, E.M. (2005). Recombinant leishmania antigens for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. *12*, 1164–1167.

Silveira, F.T., Lainson, R., De Souza, A.A.A., Campos, M.B., Carneiro, L.A., Lima, L.V.R., Ramos, P.K.S., de Castro Gomes, C.M., Laurenti, M.D., and Corbett, C.E.P. (2010). Further evidences on a new diagnostic approach for monitoring human Leishmania (L.) infantum chagasi infection in Amazonian Brazil. Parasitol. Res. *106*, 377–386.

Singh, B., and Sundar, S. (2012). Leishmaniasis: vaccine candidates and perspectives. Vaccine *30*, 3834–3842.

Singh, N., Kumar, M., and Singh, R.K. (2012). Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. Asian Pac J Trop Med *5*, 485–497.

Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M.K., Goyal, A.K., Mandal, A.K., Voss, A., Hilgard, P., and Murray, H.W. (1998). Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. Lancet *352*, 1821–1823.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Résumé

Objectif : De nombreux tests pour le diagnostic sérologique de la leishmaniose viscérale (LV) sont actuellement commercialisés, mais peu d'études comparatives incluant un nombre de patients suffisant sont disponibles. Le but de notre étude était d'évaluer les performances de tests sérologiques commercialisés en France pour le diagnostic de la LV, dans le bassin méditerranéen.

Matériel et méthodes : Les sérums de 319 patients vivant en France, au Maroc ou en Tunisie ont été collectés rétrospectivement : 181 patients (dont 65 immunodéprimés) ayant une LV confirmée par une méthode parasitologique, et 138 patients n'ayant aucun signe clinique de leishmaniose et vivant en zone d'endémie. Six tests de dépistage, soit quatre tests ELISA (Novalisa®, Bordier®, Ridascreen®, Vircell®), et deux tests immunochromatographiques de diagnostic rapide (IT LEISH® et Truquick®) ont été évalués, ainsi que la technique de confirmation par Western-blot (LDBIO). L'analyse statistique a été réalisée avec Intercooled Stata 9.2 statistical package (StataCorp, College Station, TX)

Résultats : Pour les six tests de dépistage, il y avait statistiquement plus de faux négatifs chez les patients immunodéprimés comparé au groupe immunocompétent. Dans la population globale, les sensibilités et spécificités variaient respectivement de 85.1% à 93.9% et de 95.7% à 100%. Vircell® et Bordier® ont montré des performances analytiques statistiquement supérieures aux autres tests de dépistage. De nouveaux seuils de positivité sont été proposés pour les tests ELISA Bordier®, Vircell® et Novalisa® permettant d'atteindre une sensibilité de 95% associée à la meilleure spécificité. La sensibilité de la méthode de confirmation par WB était de 100% et la spécificité a été discutée du fait de la détection de porteurs asymptomatiques.

Conclusion : Ce travail constitue la première étude comparative de tests commerciaux évalués sur une large cohorte pour le diagnostic sérologique de la LV méditerranéenne. Les performances analytiques des tests et l'analyse de praticabilité permettront de guider le choix des biologistes.

Mots clés : Leishmaniose viscérale méditerranéenne, sérologie, anticorps, ELISA, western blot, test immunochromatographique