

République Algérienne Démocrat



497THV-2

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la
Recherche Scientifique.

UNIVERSITE - SAAD DAHLAB - BLIDA
FACULTE DES SCIENCES AGRONOMIQUES ET
VETERINAIRES

DEPARTEMENT DES SCIENCES VETERINAIRES

Mémoire de fin d'étude
En vue de l'obtention du diplôme de docteur vétérinaire

Thème

Etude bibliographique des différents tests
de diagnostic de la leishmaniose canine

Présenté par :

BAGHDADI Fathia.

Membres de jury :

- *Promotrice*
- *Examineur*
- *Examineur*

Dr. ADEL Amel
Dr. DJOUDI .M
Dr. NEBRI . R

Promotion 2010/2011.

Remerciements

Au terme de ce travail, je tiens à remercier en premier lieu

« Dieu » qui m'a donnée la force pour achever ce travail.

Je remercie vivement ma promotrice Dr. ADEL Amel qui m'a beaucoup aidée durant toute la durée de mon travail.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements et ma profonde gratitude à Mr BERBER A. pour tous ses conseils.

Un remerciement spécial au département des sciences vétérinaires, et à tous mes enseignants durant les années d'études.

Dédicaces

Je remercie Dieu tout puissant qui m'a donné toute la volonté et la patience pour aboutir à la réalisation de ce travail.

Je dédie ce modeste travail

À

Mes très chers parents qui représentent la plus grande école au monde, pour leurs encouragements, soutiens et surtout leurs dévouements.

À

Mes frères, mes sœurs surtout ma grande sœur Dalila, mes neveux, mes nièces, mes beaux frères, mes belles sœurs, sans oublier mon cher cousin Mohamed.

*Mes copines Manal, Samira, Aicha.
Mes amis (es)*

A mes professeurs et maîtres

Résumé

La leishmaniose canine est une maladie infectieuse liée à la transmission, par piqûre de phlébotome, d'un protozoaire flagellé : *Leishmania infantum*. C'est une maladie zoonotique grave pour laquelle le chien est le principal réservoir de la maladie chez l'homme.

Le traitement est long, lourd et coûteux, et ne confère pas de stérilisation parasitaire, ce qui entraîne la survenue de rechutes et la persistance du parasite, faisant du chien une source d'infection pour les phlébotomes.

Plusieurs techniques spécifiques de diagnostic ont été développées pour faciliter le diagnostic. Il est essentiel de comprendre le fondement de chacun des tests de diagnostic et ses limites et en faire une interprétation appropriée. Fiables et précis, les tests de diagnostic sont essentiels pour la détection de l'infection à *Leishmania* chez les chiens malades, malgré leur manque de sensibilité et de spécificité.

Mots-clés : Leishmaniose canine ; tests de diagnostic.

Abstract

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is a vector-born zoonotic disease that is endemic in the Mediterranean basin. The dog is the main domestic reservoir for human infection by *L. infantum*,

The treatment is long, cumbersome and expensive and does not confer sterilizing parasite, which causes the occurrence of relapses and persistence of the parasite, making the dog a source of infection for sandflies.

More specific diagnostic techniques have been developed to facilitate diagnosis. It is essential to understand the basis of each diagnostic test and its limitations and the proper interpretation. Reliable and accurate diagnostic tests are essential for the detection of *Leishmania* infection in dogs sick, although their lack of sensitivity and specificity.

Key-words: Canine leishmaniasis; tests diagnosis, prophylaxis.

ملخص

داء الليشمانيات الكلبية هو أحد الأمراض المعدية المرتبطة بانتقال المرض من خلال لدغة ذبابة الرمل ، والأوالي سوطي : الليشمانية الطفيلية. هذا هو مرض خطير والحيوانية لماذا الكلب هو المستودع الرئيسي للمرض في البشر.

مدة العلاج طويلة ، مرهقة ومكلفة ، وما لا يعطي تعقيم الطفيلي ، الذي يتسبب في حدوث انتكاسات واستمرار الطفيلي مما يجعل الكلب ، مصدرا للعدوى للذبابة الرمل.

وقد تم تطوير تقنيات التشخيص أكثر تحديدا لتسهيل التشخيص. ومن الضروري لفهم أساس كل اختبار التشخيص وحدوده، والتفسير الصحيح. اختبارات تشخيصية دقيقة وموثوق بها ضرورية للكشف عن عدوى الليشمانيا في كلاب مريضة ، على الرغم من عدم وجود حساسية ونوعية .

Liste des abréviations :

°C : degré Celsius

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNk : kinétoplaste l'ADN

ARN : Acide ribonucléique

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CanL : leishmaniose canine

CCS : coeur-cerveau-sang

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CPA : Cystéineprotéine A

CL : leishmaniose cutané

CPB : Cystéine protéineB

DAT : test d'agglutination directe;

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

IFAT : le test d'immunofluorescence;

ITS1 : espaceur transcrit interne 1

LV : leishmaniose viscérale

NNN : novy-mac Neal-Nicolle

PCR : polymerase chain reaction

RFLP : polymorphisme de longueur des fragments de restriction

IV : intraveineuse

IFN : interféron

kDa : Kilodalton

FML : Ligand fucose mannose

GP63 : Glycoprotéine

TNFa : Tumor Nécrosis Factor a

Liste des figures

Figure 1 : Forme promastigote3

Figure 2 : Nombreuses formes amastigotes dans un macrophage.....3

Figure3 : *Phlebotomus* spp.....5

Liste des photos

Photo1 : Quelques signes cliniques trouvés dans CanL.....11
Photo2 : Les lésions cutanées dans CanL.....12

Liste des tableaux

**Tableau 1 : Comparaison des différents tests de laboratoire pour
le diagnostic de la Leishmaniose canine29/30**

Liste des cartes :

Carte 1 : Répartition géographique mondiale de Leishmaniose.....8

Sommaire

REMERCIEMENTS.....	I
DEDICACES.....	II
INTRODUCTION.....	1
GENERALITE SUR LA LEISHMANIOSE CANINE	
1. Définition.....	2
2. Importance.....	2
3. Etiologie.....	3
a. Le parasite.....	3
b. le vecteur.....	5
c. Répartition géographique et caractéristiques du vecteur.....	5
LES SIGNES D'APPEL DE LA LEISHMANIOSE CANINE	
1. l'importance de la leishmaniose canine dans des secteurs non endémique.....	6
2. Les considérations de santé publique de la leishmaniose canine	6
3. La différence entre l'infection et la maladie dans la leishmaniose canine.....	6
4. La prédominance de la maladie et de l'infection dans des régions endémiques	7
5. Le rôle d'immuno-réaction dans les différentes manifestations cliniques de l'infection à <i>Leishmania</i>	8
6. Fréquences des réactions immunitaires trouvées chez les chiens vivants dans des régions endémiques.....	9
7. Les chiens infectés restent-ils médicalement sains ou deviennent-ils sévèrement malades ?.....	9
8. Signe clinique de la leishmaniose canine.....	10
a. Les lésions cutanées chez les chiens à la leishmaniose.....	11
b. Les manifestations rénales oculaires chez les chiens leishmaniens	13
c. Le signes clinique rares du leishmaniose.....	13
9. Possibilité de la leishmaniose canine.....	14
DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE CANINE	
1. Comprendre les tests de diagnostic	15
a. Sensibilité.....	15
b. Spécificité.....	15
c. Valeurs prédictives.....	15
➤ Valeur prédictive positive.....	15
➤ Valeur prédictive négative.....	16
2. L'évaluation de l'infection de <i>Leishmania</i> dans les chiens avec la leishmaniose clinique suspecté et dans les chiens infectés médicalement sains.....	17
3. Apports des examens hématologiques et biochimiques	17
4. Mise en évidence indirecte du parasite	18
5. Sérologie dans le diagnostic de la leishmaniose canine:.....	19

6. Les techniques les plus répondus	19
a. Immunofluorescence indirecte (IFI)	19
b. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA).....	20
c. Éléctrosynérèse.....	21
d. Autres tests d'immunodiagnostic utile pour le pronostic chez les chiens malades.....	21
e. Réactions d'agglutination	22
❖ Hémagglutination indirecte.....	22
❖ Agglutination directe.....	22
❖ Test au latex (agglutination passive).....	23
g. Western blot.....	23
7. Mise en évidence directe du parasite.....	24
a. Prélèvement des échantillons.....	24
❖ Biopsie cutanée	24
❖ Ponction de noeud lymphatique	24
❖ Ponction de moelle osseuse	25
❖ Biopsies de rate ou de foie	25
b. Culture.....	25
❖ Milieux de culture NNN et CCS	25
❖ Technique d'inoculation à l'animal	25
c. Identification des parasites	26
❖ Coloration	26
❖ Mise en évidence des antigènes leishmaniens	27
❖ Réaction de polymérisation en chaine (PCR).....	27
❖ L'utilisation du PCR chez les chiens cliniquement sains.....	28
❖ Identification enzymatique.....	28

TRAITMENT ET PROPHILAXIE

1. Mise à jour sur la thérapie.....	32
2. Le développement de vaccins.....	33
3. Prévention et contrôle des vecteurs.....	34

CONCLUSION	36
-------------------------	-----------

Introduction

Introduction

Introduction

La leishmaniose canine est une maladie infectieuse due à la multiplication dans le système des phagocytes mononucléés d'un protozoaire appelé *Leishmania infantum* transmis par la piqûre d'un psychodidé du genre *Phlebotomus* (1).

Il s'agit d'une zoonose pour laquelle l'espèce canine constitue dans le bassin méditerranéen le réservoir du parasite. L'importance des leishmanioses dans le monde est illustrée par le nombre annuel de nouveaux cas qui se chiffre entre 1,5 à 2 millions de cas (2).

L'Algérie est concernée par trois formes cliniques sévissant à l'état endémique: la leishmaniose viscérale (LV), la leishmaniose cutanée sporadique du nord (LCS) et la leishmaniose cutanée zoonotique (3).

Cette maladie se caractérise dans sa forme classique par des symptômes généraux (abattement, amaigrissement, fièvre et anorexie) associés à des signes cutanéophanériens (alopécie, ulcères, squamosis, hyperkératose ou onychogryphose) et muqueux (épistaxis, hématurie ou diarrhée hémorragique) et par une hypertrophie du système lymphomagrophagique (adénomégalie, splénomégalie) (4).

L'évolution de la maladie est lente, souvent fatale en l'absence de traitement. La thérapeutique s'appuie essentiellement sur un traitement spécifique systématique (composés stibiés) et un traitement complémentaire (allopurinol, substances immuno-modulatrices, reconstituants généraux) (5).

Si les examens cliniques, hématologiques et biochimiques permettent de suspecter l'infection, le diagnostic de certitude passe par la mise en évidence directe ou indirecte du parasite dans différents types de prélèvement (sang, ponction de nœud lymphatique ou de moelle osseuse, biopsie de peau).

Elle peut être réalisée facilement de façon indirecte par plusieurs techniques de sérologie (agglutination, immunofluorescence indirecte, ELISA, électrosynérèse, western – blot) chacune présentant des qualités particulières (sensibilité, spécificité, facilité de mise en œuvre, suivi thérapeutique).

Les techniques de diagnostic directe par coloration, mise en culture PCR, identification enzymatique ou par détection d'antigènes spécifiques sont plus spécifiques mais à l'exception de la coloration de mise en œuvre plus difficile, notamment pour évaluer l'efficacité d'un traitement.

L'objectif du présent travail est de réaliser une revue de littérature synthétisant les différentes méthodes de diagnostic de la leishmaniose canine.

Généralité sur la leishmaniose canine

1. Définition

La leishmaniose canine est une maladie infectieuse liée au développement et à la multiplication dans les cellules du système des phagocytes mononucléés d'un flagellé : *Leishmania infantum*, transmis par la piqûre d'un Psychodidé, insecte Diptère Nématocère appartenant au genre *Phlebotomus* (1).c'est une zoonose très répandue dans le bassin méditerranéen (2).

Ce parasite est responsable d'une affection caractérisée cliniquement par une atteinte générale, une atteinte cutanéomuqueuse et une hypertrophie ganglionnaire d'évolution lente aboutissant souvent à la mort de l'animal (3).

C'est une maladie chronique, évoluant sur plusieurs mois, difficile à traiter, fréquemment sujette à des rechutes, et donc de pronostic réservé. Il s'agit de plus d'une zoonose, le chien étant une source de parasites pour les phlébotomes qui peuvent transmettre ensuite la maladie à l'homme par piqûre. Le chien constitue le réservoir principal de la leishmaniose humaine.

2. Importance

Leishmaniose humaine, causée par plusieurs espèces de *Leishmania*, comprend un groupe de maladies qui sont principalement des zoonoses. Il s'agit notamment de la LV, qui implique les organes internes et est mortelle si non traitée, et les formes cutanées et cutanéomuqueuses (CL), qui affectent la peau ou les jonctions cutanéomuqueuses et peuvent guérir spontanément, cicatrices disgracieuses laissant (4). Ce groupe d'infections est le troisième plus important de maladies à vecteur, après le paludisme et la filariose lymphatique. Elle est endémique dans de nombreuses régions tropicales et sub-tropicales de l'Ancien Monde et Nouveau. La leishmaniose est endémique dans 88 pays, avec plus de 350 millions de personnes à risque. L'incidence estimée est de 2 millions de nouveaux cas par an, 0,5 million de VL et 5 millions de CL (2). La leishmaniose viscérale provoque une estimation de 59 000 décès par an (soit un taux parmi les maladies parasitaires dépassé seulement par le paludisme), et de 2.357.000 années de vie perdues ajustées sur l'incapacité (DALY), en plaçant la leishmaniose 9ème dans une analyse globale des maladies infectieuses (2). La leishmaniose est l'une des grandes maladies infectieuses qui affectent la vie des populations les plus pauvres du monde surtout dans les zones rurales et suburbaines (5).

En médecine vétérinaire, la leishmaniose causée par *L. infantum* est surtout importante chez les chiens. La leishmaniose canine est une des principales zoonoses globalement causant une grave maladie mortelle chez les chiens. L'infection chez les chats (7), canidés sauvages (8) et les chevaux (9) a également été signalé dans les zones où la maladie est fréquente chez les chiens.

Généralité sur la leishmaniose canine

3. Etiologie

a. Parasite

Les leishmanies sont des protozoaires de la classe des Flagellés, de la famille des Trypanosomatidés et du genre *Leishmania*.

C'est un parasite diphasé

- une forme promastigote, observée uniquement chez le vecteur et en culture : il s'agit d'un élément allongé, de 15-20 μm , avec un flagelle libre ;



Figure 1 : Forme promastigote

(photo laboratoire de parasitologie - ENVL)

- une forme amastigote, observée dans les cellules du système des phagocytes mononucléés du chien, élément globuleux de 2 à 4 μm de diamètre, possédant un flagelle intracytoplasmique (non visible en microscopie optique), un noyau volumineux et un kinétoplaste (10).



Figure 2 : Nombreuses formes amastigotes dans un macrophage

(Photo laboratoire de parasitologie - ENVL)

Généralité sur la leishmaniose canine

La paroi des leishmanies est constituée d'une membrane externe et d'une membrane interne et renferme des composants jouant un rôle important dans l'endocytose des parasites et dans les phénomènes immunologiques accompagnant les infections leishmaniennes (11) :

- du lipophosphoglycane (LPG) ;
- des glycolipides et glyco-inositolphospholipides ;
- des enzymes ;
- des glycoprotéines : gp63, gp42, gp43 (laminine de surface), gp46 ;
- des cystéines protéinases ;
- une protéine de la famille tryptophane-acide aspartique, le LACK.

Il semble que ces composants soient des molécules-clés intervenant dans le métabolisme des parasites et qu'ils puissent jouer un rôle important dans leur pathogénicité, leur virulence et dans les interactions hôte-parasite. Ils représentent donc des cibles moléculaires intéressantes en immunothérapie et en chimiothérapie.

Le cytoplasme contient une kinase jouant un rôle dans la survie des leishmanies dans les cellules parasitées (11).

Les leishmanies vivent au sein des macrophages, en particulier dans la lymphe dermique, les noeuds lymphatiques, la rate, le foie et la moelle osseuse. Elles sont exceptionnellement rencontrées dans les monocytes sanguins. Elles survivent à la phagocytose et à l'agression oxydative du macrophage et se multiplient par division binaire longitudinale. Cette multiplication peut engendrer la lyse du macrophage: les parasites sont alors libérés puis phagocytés par d'autres macrophages. Ceci conduit à la diffusion des leishmanies dans l'organisme (10; 12 ; 13).

Le cycle évolutif fait intervenir les phlébotomes et les chiens.

Chez les arthropodes, les leishmanies ingérées lors d'un repas sanguin se multiplient par scissiparité, et évoluent dans le tube digestif, en partie supra-pylorique. Seuls les phlébotomes femelles peuvent intervenir comme vecteurs biologiques. Étant donné que les phlébotomes se nourrissent par telmophagie, c'est-à-dire par l'absorption d'un mélange de sang et de lymphe constitué dans le derme suite à l'action traumatisante des pièces buccales et la sécrétion d'une salive histolytique, ce sont essentiellement des leishmanies présentes dans le derme qui assurent le passage à l'arthropode (10)

Les leishmanies ont un double mode de vie pour un double habitat : elles sont intracellulaires chez le chien et extracellulaires chez le vecteur. La forme amastigote ingérée par le vecteur se transforme en leishmanie promastigote, qui se multiplie et sera inoculée au chien. Le cycle évolutif est dixène, et dure 2 à 3 semaines au bout desquelles des promastigotes infectants pour les vertébrés, sont présents dans les pièces buccales de l'insecte (10).

Généralité sur la leishmaniose canine

b . Le vecteur

Le phlébotome est un Diptère Nématocère Psychodidé, de couleur gris jaunâtre. Il est de petite taille (2-3 mm) et son corps est grêle. Il possède une paire d'ailes lancéolées velues, dressées en « V » au repos. Son thorax bombé lui donne un aspect bossu (10).

La femelle phlébotome est telmophage : elle se nourrit d'un mélange de sang et de lymphes formé à la suite d'une piqûre, assurée par des pièces buccales de fort calibre. Ce repas s'effectue de manière interrompue, à la suite de plusieurs piqûres, sur le même individu ou non. Le repas se compose aussi de l'absorption de sucres obtenus en particulier à partir de sève végétale. Cet apport se révèle d'ailleurs indispensable à la transformation et à la multiplication des leishmanies dans le tube digestif du phlébotome (10). La salive inoculée est allergisante (érythème, douleur) et participe activement à l'installation et la multiplication des leishmanies chez l'hôte (14).

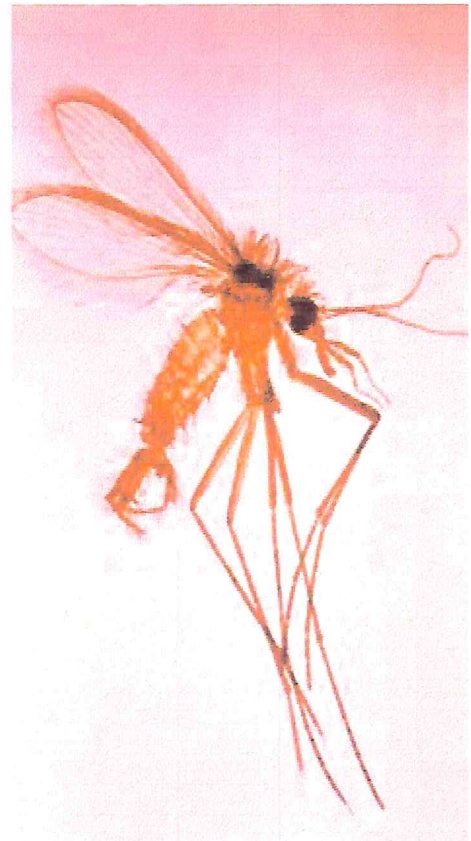


Figure 3: *Phlebotomus* spp.
Site internet : Wikipedia

c. Répartition géographique et caractéristiques du vecteur

Les vecteurs du genre phlébotome (Vieux Monde) ou *Lutzomyia* (nouveau monde) sont les principaux vecteurs de *Leishmania* (14;15). Les phlébotomes sont principalement présents dans les pays tropicaux ou sont en activité pendant les mois relativement chauds de l'année dans les pays tempérés. L'activité du phlébotome adulte est crépusculaire et nocturne du premier ressort à l'automne en retard dans le bassin méditerranéen et toute l'année en Amérique du Sud (14 ; 15). Sa gamme d'activité est entre 15 et 28 °C, et est toujours associée à l'hygrométrie et à l'absence élevées du vent ou de la pluie. Le phlébotome peut voler sur des distances de 200 m à 2,5 kilomètres et peut entrer dans des maisons de nuit due à leur phototropisme positif (14 ; 15).

1. Importance de la leishmaniose canine dans des secteurs non endémiques

La maladie peut être diagnostiquée dans les pays non endémiques chez les chiens qui avaient vécu ou voyagé dans des secteurs endémiques (14). Les plus grands nombres de chiens voyageant au Sud de l'Europe et importés comme animaux de compagnies des secteurs endémiques ont soulevé des préoccupations concernant l'introduction des maladies vectorielle, telles que la leishmaniose canine, dans les régions non endémiques de l'Europe (16). Une étude des Pays Bas a constaté qu'environ 58.000 chiens voyagent annuellement de Hollande vers le Sud de l'Europe avec leurs propriétaires pendant les vacances et que le risque d'acquérir la leishmaniose canine est de 0,027-0,23% (17). Les chiens infectés dans des secteurs non endémiques peuvent également contribuer à l'entretien du parasite dans la population canine par des modes de transmission rares mais possibles. En outre, l'infection par *L. infantum* s'est étendue au nord de l'Europe, atteignant les collines des Alpes en Italie nordique (18). La transmission pourrait se produire dans un nouveau secteur si des chiens infectés sont importés et si la population des vecteurs est assez grande. Les changements de la dynamique des populations de phlébotomes peuvent mener à la création de nouveaux foyers permanents.

2. Les considérations de santé publique de la leishmaniose canine

Les chiens sont considérés comme le réservoir le plus important péri-domestiques de *L. infantum* responsable de l'infection chez les humains. Cependant, une seule étude réalisée en Iran a montré que la possession d'un chien infecté est un facteur de risque pour l'infection humaine (19). La présence de chiens infectés dans le voisinage des humains est certainement associée à la transmission de l'infection, mais, la présence effective d'un chien infecté dans le ménage ne semble pas augmenter considérablement le risque d'infection à la famille lorsque la transmission est déjà en place dans la région. Par conséquent, le danger pour les propriétaires de chiens à la leishmaniose semble faible. L'efficacité de l'élimination des chiens séropositifs au Brésil pour diminuer l'infection humaine est contestable et plusieurs rapports ont prétendu qu'elle n'était pas utile (21)

3. La différence entre l'infection et la maladie dans la leishmaniose canine

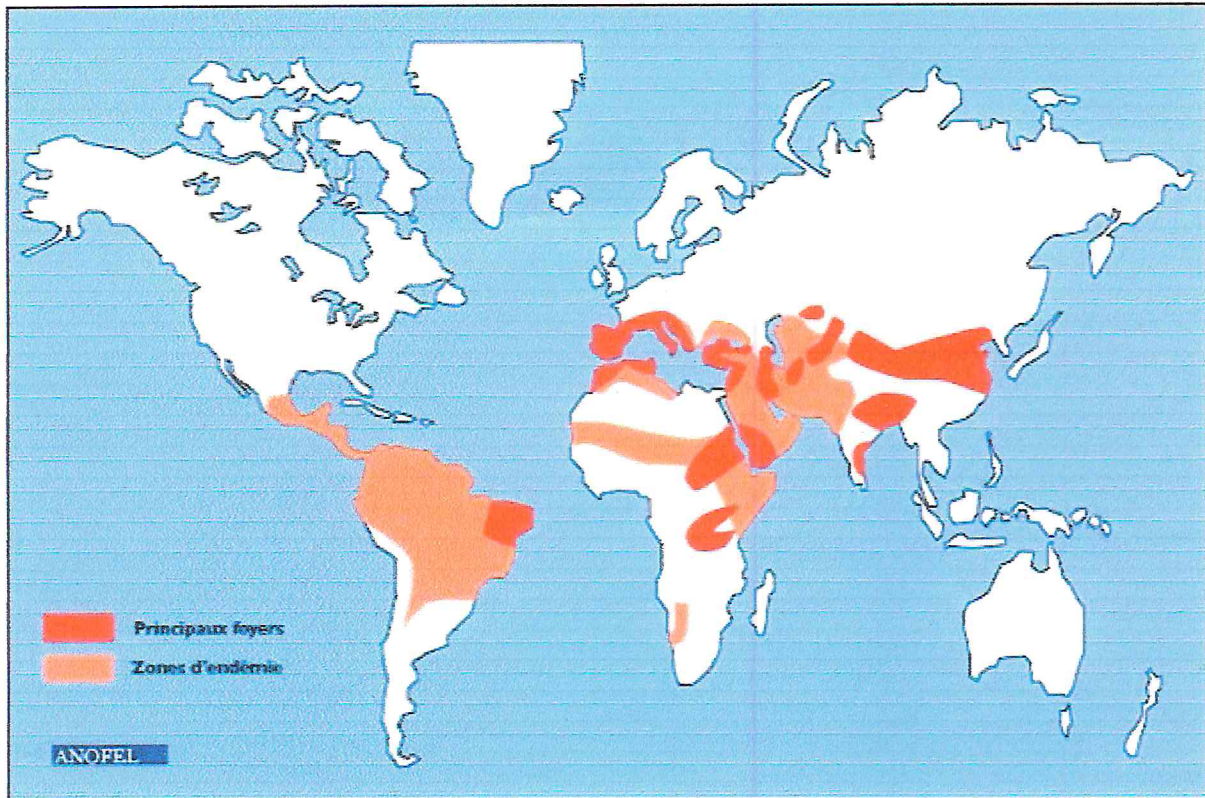
Le concept traditionnel que tous les chiens infectés par *L. infantum* finiront par développer de graves leishmanioses cliniques après une période d'incubation variable a été réfuté (22). La leishmaniose canine est une maladie dans laquelle l'infection n'est pas égale à la maladie clinique

Les signes d'appel

due à la forte prévalence de l'infection subclinique (23). Dans le passé, les chercheurs ont utilisé la classification clinique des chiens asymptomatiques, oligosymptomatiques et polysymptomatique basée uniquement sur les résultats de l'examen physique (24). Ce classement a une valeur limitée, car elle ne tient pas compte des anomalies clinicopathologiques et les chiens qui ont fait un dysfonctionnement organique généralisé, sans apparente manifestations visuelles (25). Les auteurs définissent les chiens avec la leishmaniose clinique quand ils présentent des signes cliniques et / ou des anomalies clinicopathologiques et une confirmation d'une infection par *L. infantum*. Les chiens avec une infection subclinique, ou cliniquement sains, sont définis comme ceux qui ne présentent pas de signes cliniques, ni à l'examen physique, ni d'anomalies clinicopathologiques par des tests de laboratoire de routine (CBC, le profil biochimique et analyse d'urine), mais ont une confirmation d'une infection à *L. infantum*.

4. La prédominance de la maladie et de l'infection dans des régions endémiques

La majorité des chiens infectés par *Leishmania* ne développent pas de signes cliniques ou d'anomalies clinicopathologiques et la prévalence de la maladie est souvent inférieure à 10% dans les régions endémiques ; bien que la séropositivité est trouvée dans presque tous les chiens avec une maladie clinique. Les études épidémiologiques utilisant des techniques moléculaires dans les zones où CanL est endémique ont montré que la prévalence de l'infection canine à *Leishmania* peut être considérablement plus élevée que la séroprévalence et la prévalence de la maladie (23). L'infection à *L. infantum* chez les chiens est endémique dans environ 50 pays en Europe, Afrique, Asie et les Amériques (5), avec des taux variables de prévalence, selon les conditions écologiques et climatiques qui déterminent l'abondance des vecteurs. Plusieurs rapports ont révélé l'émergence de l'infection dans de nouveaux endroits ainsi que son augmentation dans les zones d'endémicité précédemment établies (18).



Cartel : Répartition géographique mondiale de Leishmaniose.

5. Le rôle d'immuno-réaction dans les différentes manifestations cliniques de l'infection à *Leishmania*

Un large éventail de réponses immunitaires et de manifestations cliniques ont été décrites dans la CanL. L'infection à *Leishmania* chez les chiens peut se manifester comme une infection subclinique, une maladie avec auto-limitation (26), ou une maladie sévère sans auto-limitation. Chez les chiens, deux opposés de ce spectre clinique sont caractérisés par:

- 1) L'immunité protectrice qui est médiée par les cellules T CD4 la libération de l'interféron- γ , IL-2 et TNF α qui induisent des macrophages anti-*Leishmania*,
- 2) Susceptibilité à la maladie qui est associée à la production d'une marque humorale sans réponse immunitaire protectrice et une immunité cellulaire médiée réduite ou déprimée avec un mélange Th1 et Th2 de réponse des cytokines (5; 23).

Dans ce spectre, la maladie clinique peut aller d'une dermatite bénigne papuleuse associée à l'immunité cellulaire spécifique et de faible réponse humorale (27) à une maladie grave caractérisée par une atteinte rénale avec glomérulonéphrite due au dépôt de complexes immuns associés (28).

6. Fréquences des réactions immunitaires trouvées chez les chiens vivants dans des régions endémiques

Les schémas des réponses immunitaires chez les chiens exposés à l'infection à *Leishmania* basés sur des études publiées sur des chiens naturellement et expérimentalement infectés ont été décrits dans une zone d'endémie à un moment donné du temps en utilisant plusieurs techniques pour la détection de l'exposition au parasite (sérologie, évaluation de l'immunité cellulaire avec des tests cutanés ou leishmanine, test de prolifération lymphocytaire). L'évaluation clinique, a montré que généralement 5 à 10% des chiens sont malades et environ 90-95% sont cliniquement sains. Dans un modèle hypothétique (29), le groupe des chiens apparemment sains peut être divisé en un sous-groupe d'environ un tiers qui n'est pas infecté et les deux tiers qui sont infectés. Vingt-deux pour cent des chiens infectés seront considérées comme sensibles à l'évolution de la maladie clinique due à la réponse cellulaire déprimée et la présence de la réponse humorale. Les chiens développeront probablement des signes cliniques et / ou clinicopathologiques plus tard. Quarante-sept pour cent des chiens infectés sont considérés comme "résistants" en raison de la présence d'une réponse cellulaire contre *Leishmania* démontrables. Vingt-sept pour cent des chiens "résistants" présenteront la réponse cellulaire et humorale et 18% présenteront une réponse cellulaire seulement (29). Cependant, l'infection subclinique n'est pas nécessairement permanente et des facteurs tels que les maladies concomitantes et l'immunosuppression pourraient casser l'équilibre et mener à la progression de la maladie clinique chez les chiens comme cela a été observé chez les humains co-infectés par le virus de l'immunodéficience humaine et *Leishmania* (5).

7. Chiens infectés restent-ils médicalement sains ou deviennent-ils sévèrement malades ?

On ne sait pas avec certitude quels sont les mécanismes responsables de la résistance ou de la sensibilité chez le chien, ni la façon dont des facteurs comme l'âge, le sexe, la nutrition, génétique de l'hôte, les co-infections et / ou maladies concomitantes, conditions immunosuppressives, l'environnement de cytokines, la charge parasitaire virulence des souches de *Leishmania*, les infections antérieures et le mode de transmission peuvent affecter la polarité des manifestations cliniques de

Les signes d'appel

l'infection à *Leishmania*. Certaines races de chiens tels que le Boxer, Cocker, Rottweiler et Berger Allemand semblent être plus sensibles au développement de la maladie (30). Tandis que d'autres tels que le chien Ibizian développent rarement des signes cliniques (29). Le *Slc11c1* (famille porteuse de solutés 11 membres a1) gène, anciennement nommée N-Ramp1, et certains allèles des gènes du CMH II ont été associées à une prédisposition à CanL (31). L'âge semble être un facteur important. Les pics de prévalence de CanL ont été signalés chez les chiens de moins de 3 ans et plus de 8 ans (32). Les hamsters mâles expérimentalement infectés semblent être plus sensibles à la maladie en développement que les femelles (33). Chez les chiens, certaines études épidémiologiques n'ont pas déclaré la prédisposition des sexes (34) alors que d'autres études ont rapporté un risque plus élevé de la maladie chez les chiens mâles (35). En outre, les infections canines expérimentales ont montré comment les différentes voies d'infection et les stades de vie du parasite utilisés pour l'infection, vont entraîner des manifestations cliniques divergentes. L'infection intradermique et l'inoculation de promastigotes conduira probablement à une infection subclinique tandis que les infections par voie intraveineuse par des amastigotes se manifestent comme une maladie grave (5).

8. Signes cliniques de la leishmaniose canine

Les caractéristiques cliniques de la leishmaniose varient largement comme une conséquence des mécanismes pathogéniques de nombreux processus de la maladie, les différents organes concernés, et la diversité des réponses immunitaires montrés par des hôtes individuels (23).

La CanL est une maladie systémique qui peut potentiellement impliquer tout fluide, organes, et tissus biologiques, et se manifeste par des signes cliniques non spécifiques. Les principaux résultats cliniques disponibles sur l'examen physique dans CanL classiques incluent des lésions cutanées, généralisée, lymphadénomégalie, perte de poids progressive, atrophie musculaire, intolérance à l'exercice, perte d'appétit, la léthargie, une splénomégalie, une polyurie et la polydipsie, lésions oculaires, épistaxis, onychogryphose, boiteries, des vomissements et la diarrhée (23). Les signes cliniques variables et non spécifiques rendent la liste des diagnostics différentiels à CanL largement étendu.

Les signes d'appel



Photo1 : Quelques signes cliniques trouvés dans CanL :

A) Epistaxis; B) uvéite bilatéral et opacité cornéenne; C) conjonctivite purulente et blepharitis; D) Exfoliative alopecie dans la jambe arriere ; E) cachexie et alopecie généralisé.

a. Les lésions cutanées chez les chiens leishmaniens

Les lésions cutanées sont les plus communes chez les chiens admis en consultation (36). Les lésions cutanées peuvent être observés seules ou avec d'autres signes cliniques et / ou des anomalies clinico-pathologiques. Plusieurs entités dermatologiques ont été décrites (22, 36):

- non prurigineuses érythrodermie avec ou sans l'alopecie qui peut être généralisée ou localisée sur le visage, les oreilles et les membres,
- dermatite ulcéreuse au niveau des proéminences osseuses, les jonctions cutané-muqueuses, les pattes, les oreilles,
- dermatite nodulaire focale ou multifocale,

Les signes d'appel

- dermatite proliférative cutanéomuqueuse,
- dermatite papuleuse (26, 27).

Les manifestations cutanées atypiques telles que la dépigmentation, la panniculite, l'hyperkératose, l'éruption pustuleuse, la pelade ou l'alopecie pemphigus foliacé et erythémamultiforme sont relativement rares (37) La pyodermite à *Staphylocoques*, superficielle ou profonde, est une complication fréquente (38).



Photo2 : Les lésions cutanées dans CanL :

- A) l' alopecie et blépharites; B) lésion cutanéomuqueuse nasales ulcératives; C) dermatite papuleuse dans la région inguinale; D) lésions cratériformes nodulaires bordant la muselière ; E) lésions érythémateuse ulcératives sur la surface plantaire de la patte et entre protections ; F) Onychogryffose**

b. Les manifestations rénales et oculaires chez les chiens leishmaniens

Chez les chiens malades, il est essentiel d'évaluer la fonction rénale (39). La CanL est associée à une forte prévalence de la maladie rénale chronique (28). La maladie rénale peut être la seule manifestation clinique chez les chiens malades et peut évoluer d'une protéinurie légère à un syndrome néphrotique ou une insuffisance rénale terminale. Le diagnostic précoce de la maladie rénale est bénéfique pour le patient et peut prolonger sa vie. L'insuffisance rénale chronique (IRC) est une manifestation grave de progression de la maladie et est la principale cause de décès des animaux dans les CanL. Plusieurs études ont décrit la présence de lésions histologiques dans 100% des chiens évalués (40). Malgré la forte prévalence de la pathologie rénale, l'insuffisance rénale typique avec azotémie est inhabituelle et il est évident que lorsque la majorité des néphrons deviennent dysfonctionnelles pendant la progression de la maladie, la glomérulonéphrite et néphrite tubulo-interstitielle sont les conclusions pathologiques les plus courantes tandis que l'amylose est très rare (28). La glomérulonéphrite est fréquemment associée à la déposition glomérulaire de complexes immuns et est principalement membrano et / ou mésangioproliférative (41). Autres types histologiques de la maladie glomérulaire (membraneuse, segmentaire et focale, chroniques, les changements minimes) ont également été décrites (41). La Glomérulonéphrite membranoproliférative est plus fréquemment associée à IRC, tandis que chez les chiens sans preuve clinicopathologiques de la maladie rénale, l'évaluation histopathologique des lésions révèle généralement une glomérulonéphrite mésangioproliférative avec changement minime (41).

La prévalence relative des lésions oculaires et péri-oculaires dans CanL a été rapportée à la gamme de 16% à 80% (42). Les manifestations les plus fréquentes sont la conjonctivite, blépharite (exfoliatrice, hémorragique, ou nodulaire), uvéite antérieure et la kératoconjonctivite (43). Conséquences oculaires de l'hypertension systémique (par exemple, le décollement de la rétine et / ou hémorragies, la rétine avec tortuosité artérielle, hyphéma) sont assez rares car ils ont été vus dans seulement 5,7% des chiens hypertendus avec CanL (44). L'histopathologie oculaire de 60 cas CanL a révélé une inflammation granulomateuse à lymphoplasmocytaire, avec la présence du parasite (56, 2%) dans les tissus oculaires, en particulier dans le corps de la conjonctive, limbe et ciliaire (45).

c. Les signes cliniques rares de la leishmaniose canine

Les formes cliniques rares (37) incluent des lésions des muqueuses (cavité buccale, langue et organes génitaux), le gonflement commun avec polyarthrite érosive ou non-érosive, des lésions ostéolytiques et ostéoproliférative des os, l'hépatite chronique (46), la colite de rechute chronique (47), la maladie neurologique due à la méningite et la myosite du muscle masséter ou la poly myosite atrophique (48), les

désordres auto-immuns et les désordres cardio-vasculaires tels que la péricardite et le syndrome d'hyperviscosité du sérum.

9. Possibilité d'une leishmaniose canine

Les cliniciens doivent suspecter la CanL quand les chiens présentent une protéinurie rénale persistante (créatinine urinaire ratio de protéines (UPC) 0.5) ou rénale azotémie (IRIS stades II, III ou IV de CRF) (39), hyperglobulinémie anémie non régénérative (maladies chroniques et / ou CRF), une leucocytose ou une leucopénie, hyperprotéinémie sériques, bêta et gamma poly clonales, hypoalbuminémie, diminution de l'albumine / globuline et une élévation de l'activité des enzymes hépatiques (36,49). L'hyperviscosité du sérum, la thrombocytopathie (50), la thrombocytopénie, les troubles de l'hémostase secondaires et de la fibrinolyse (49) peuvent également être détectés.

Le type d'infiltrat inflammatoire dans les tissus de cytologie (ponctions, frottis) ou l'histopathologie des organes comme la peau, le foie, l'intestin, les yeux, la rate, les ganglions lymphatiques, les muscles striés, la synovie, la muqueuse nasale, etc, est communément soit pyogranulomateuse, agranulomateuse et / ou lymphoplasmocytaire (45,47,50,51). Typiquement, il y a une hyperplasie lymphoïde réactive dans les organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques et la rate ainsi que la moelle osseuse (52, 53,54) et un nombre variable d'amastigotes de *Leishmania*.

1. Comprendre les tests de diagnostic

L'utilité des examens de diagnostic réside dans leur capacité à détecter la maladie ou l'exclure. Elle est habituellement décrite par des limites telles que la sensibilité, la spécificité, la valeur prédictive positive et la valeur prédictive négative. Beaucoup de cliniciens sont fréquemment peu informés sur l'application pratique de ces limites (55).

a. Sensibilité

La sensibilité est la proportion de sujets infectés qui sont testés positifs. La sensibilité peut être uniquement estimée dans un groupe de sujets infectés (56). Ceci signifie que la sensibilité d'un essai indique seulement la capacité du test de diagnostic à identifier les individus infectés. La sensibilité n'apporte aucune indication sur la proportion d'individus non infectés qui testeraient positifs.

b. Spécificité

La spécificité est la proportion de sujets non infectés qui sont testés négatifs. La spécificité peut être uniquement estimée dans un groupe de sujets non infectés (56). Ceci signifie que la spécificité d'un essai indique seulement la capacité du test de diagnostic à identifier les individus non infectés. Elle n'apporte aucune indication sur la proportion d'individus infectés qui testeraient négatifs.

c. Valeurs prédictives

L'objectif d'un test de diagnostic est d'utiliser ses résultats pour poser un diagnostic, nous avons donc besoin de connaître la probabilité que le résultat du test nous donnera le bon diagnostic. Les valeurs prédictives positive et négative décrivent la probabilité qu'un patient soit infecté une fois les résultats des tests sont connus.

❖ Valeur prédictive positive

La valeur prédictive positive (VPP) d'un test est définie comme la proportion d'individus ayant un résultat positif et qui réellement ont la maladie (56).

Diagnostic de la leishmaniose canine

❖ **Valeur prédictive négative**

La valeur prédictive négative d'un essai est la proportion des individus avec un résultat négatif au test et qui n'ont pas la maladie (56).

Le diagnostic est habituellement cherché pour des raisons principales :

- pour confirmer la maladie chez les chiens médicalement suspectés.
- pour étudier la présence de l'infection pour des études épidémiologiques,
- pour dépister des chiens apparemment sains vivants dans des régions endémiques
- pour empêcher la transmission des porteurs sains par transfusion sanguine
- pour éviter l'importation des chiens infectés aux pays où la leishmaniose n'est pas endémique,
- pour le monitoring du traitement.

Pour toutes ces raisons, il est important de séparer l'infection à *Leishmania* de la maladie lors de l'application des différentes techniques de diagnostics (36, 51).

Le diagnostic précis de la leishmaniose canine est complexe. Il exige souvent un diagnostic clinicopathologique se composant d'approches intégrées et d'essais spécifiques en laboratoire. Plusieurs techniques spécifiques ont été développées pour faciliter le diagnostic. Il est essentiel et approprié de comprendre la base de chaque examen, de son interprétation et de ses limitations. Les examens de diagnostic fiables et spécifiques sont essentiels pour la détection de l'infection à *Leishmania* chez les chiens malades ou infectés bien qu'ils manquent de sensibilité et de spécificité (36, 51).

Les approches les plus utiles pour l'investigation de l'infection chez les chiens malades et apparemment sains incluent :

- La détection des anticorps anti-*leishmania* par des techniques sérologique quantitatives.
- La démonstration de l'ADN leshmanien dans les tissus en appliquant des techniques moléculaires (36.51).

Diagnostic de la leishmaniose canine

2. Evaluation de l'infection a leishmania dans les chiens avec une leishmaniose clinique et dans les chiens infectés médicalement sains

Chez les chien avec des signes cliniques et/ou des anomalies clinicopathologiques compatibles avec une leishmaniose, les méthodes de diagnostics incluent la détection des amastigotes dans les souillures cytologiques (ponctions des lésions cutanées, des ganglions lymphatiques, de la moelle et de la rate) (5) Moins généralement, la cytologie est effectuée sur d'autres tissus ou liquides corporels (20, 57). Cependant, la recherche des amastigotes par la cytologie pourrait être infructueuse due aux nombres faibles à modérés de parasites discernables même chez les chiens malades (58). Les leishmanies peuvent également être observés dans les sections histopathologiques de biopsie de la peau ou d'autre organes infectés. Une infection à *Leishmania* peut être suspectée lors d'inflammations pyogranulomateuses à granulomateuses de différents tissus (50) et/ou d'hyperplasie réactive des ganglions lymphatiques (52,54). L'identification définie des parasites dans des macrophages de tissu peut être difficile et une méthode de contamination immunohistochemique peut être utilisée pour détecter ou confirmer la présence de Leishmanies dans le tissu. L'isolement dans la culture des parasites des tissus infectés n'est pas approprié au diagnostic rapide et a une sensibilité plus faible que l'ACP et la sérologie. La culture de parasite est actuellement employée plus souvent dans la recherche (59).

3. Apports des examens hématologiques et biochimiques

L'anémie est souvent un symptôme récurrent chez le chien leishmanien. Elle est normochrome et normocytaire. Elle s'aggrave souvent avec l'état général. L'anémie est souvent observée à l'examen clinique d'un chien asthénique. Le myélogramme réalisé alors pour son exploration permet quelquefois la mise en évidence du parasite.

Les numérations et formules leucocytaires peuvent présenter des variations contradictoires. Ainsi, au début de la maladie une leucocytose est observée (un mois après inoculation) mais pour une pathologie plus ancienne, elle laisse place a une leucopénie, conséquence d'une lymphopénie. La triade classique retrouvée chez l'homme associant anémie, leucopénie et thrombopénie n'est pas toujours retrouvée chez le chien car la thrombopénie, comme la monocytose, n'est pas caractéristique bien qu'on l'observe couramment (60).

Diagnostic de la leishmaniose canine

L'hyperprotéinémie est aussi une caractéristique de la leishmaniose même si elle ne constitue en soi qu'un reflet d'une réponse humorale non spécifique.

L'électrophorèse de ces protéines permet d'imputer leur élévation à celle des globulines (α 2 et β) de telle sorte que le rapport albumine/ globulines est effondré. La réaction de formol-gélification pouvait permettre de mettre en évidence cette inversion, mais elle manquait de spécificité et était souvent commune à plusieurs maladies chroniques et cachectisantes. C'est pour cette raison qu'il s'agit d'une technique maintenant abandonnée (61).

Sur le tracé électrophorétique, on observe la présence d'un bloc β - γ dit en « pain de sucre ». Une analyse détaillée du trace β - γ et α 2 peut permettre de déterminer le stade d'évolution de la maladie: leishmaniose récente si la globuline β 3 est prédominante, phénomène inflammatoire ou nécrose d'un organe secondaire avec un pic α 2.

Le rapport albumine/globulines est fonction de la gravité de l'atteinte et diminue à mesure que le traitement est entrepris. Il peut donc servir au contrôle du traitement même s'il n'est pas très spécifique (62).

Le dosage de l'urée et de la créatinine n'a pas en lui-même de valeur diagnostique mais un résultat défavorable (urémie et/ou créatininémie augmentée) doit être pris en compte dans l'instauration d'un traitement notamment en réduisant les doses d'antimoniés néphrotoxiques.

Le dosage urinaire de la gamma glutamyl transférase, N-acétylbétaD- glycosaminidase et de la bétaglucuronidase permettrait de détecter une atteinte rénale précoce mais probablement peu spécifique de la leishmaniose (63).

Tous ces examens complémentaires associés à la clinique et au contexte épidémiologique (vie en zone d'endémie, sortie vespérale.. .) permettent quelquefois de faire le diagnostic différentiel de la leishmaniose avec les dermatoses auto-immunes, la démodécie sèche et suppurée ou d'autres maladies anémiantes et cachectisantes du chien mais le diagnostic de certitude repose en fait sur la mise en évidence du parasite (64).

4. Mise en évidence indirecte du parasite

La mise en évidence indirecte du parasite est réalisée au moyen de différentes techniques sérologiques permettant la mise en évidence d'anticorps spécifiques de *Leishmania infantum*. Elle constitue la base essentielle du diagnostic biologique chez le chien. Les quantités de sérum nécessaires sont très faibles (une centaine de μ l) (65, 66).

Diagnostic de la leishmaniose canine

5. Sérologie dans le diagnostic de la leishmaniose canine

Le diagnostic de la leishmaniose canine peut être fait par la détection des anticorps spécifiques de sérum (IgG) utilisant des techniques sérologiques quantitatives, telles que l'essai d'anticorps d'immunofluorescence (IFAT) et l'analyse enzyme-linked d'immunosorbant (ELISA). Des niveaux élevés d'anticorps sont associés au parasitisme élevé et à la maladie (67). Quelques chiens restent séronégatifs pendant des périodes variables après avoir été infecté par *Leishmania* (68). Cependant, en raison de la période d'incubation relativement longue, les chiens malades sont susceptibles d'être séropositifs (69). Il est important de soumettre des échantillons à un laboratoire qui peut fournir les techniques sérologiques quantitatives

Un niveau élevé d'anticorps est concluant d'un diagnostic de leishmaniose canine. Cependant, la présence de niveaux bas d'anticorps n'est pas nécessairement indicative de la maladie et davantage de manoeuvre est nécessaire pour confirmer ou exclure la leishmaniose clinique par d'autres méthodes diagnostics telles que la cytologie, l'histopathologie et l'ACP (59).

6. Les techniques les plus répandues

IFAT, ELISA et des dispositifs d'immunochromatographie sont les techniques les plus couramment utilisés pour la détection des anticorps antileishmaniens (5, 59, 70). Des résultats faussement positifs dus à une réactivité sérologique croisée avec d'autres agents pathogènes ont été décrits dans l'ensemble des techniques sérologiques mentionnées ci-dessus, en particulier dans les domaines de *Trypanosoma cruzi* dans les Amériques avec d'autres espèces de *Leishmania* (71, 72) Des réactions croisées sont moins susceptibles de se produire lors de l'utilisation de peptides recombinants tels que rA2, rK9, rK26 et rK39 qu'avec des tests utilisant des antigènes bruts du parasite entier (72, 73).

a . Immunofluorescence indirecte (IFI)

Les formes promastigotes de la souche de référence de *Leishmania infantum* (zymodème MON-1) sont fixées sur des lames ou sont déposées les différentes dilutions des sérums à tester. Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé par une antiglobuline de chien couplée à une substance fluorescente en lumière ultraviolette. La lecture des lames au microscope est fastidieuse et nécessite un personnel expérimenté pour être reproductible (74).

C'est la méthode de référence pour le diagnostic de la leishmaniose. Le seuil de positivité a été fixé au 1/100 pour le diagnostic individuel mais pour les enquêtes de masse, on préfère utiliser

Diagnostic de la leishmaniose canine

le 1/50 pour rendre compte du niveau d'infestation dans une population donnée. En pratique, comme il n'existe pas d'homogénéité de dilutions et de lecture entre les différents laboratoires, il est classique de répondre douteux pour un titre au 1/50 et positif pour un titre au 1/100.

C'est une méthode très sensible et spécifique ; les quelques réactions croisées connues chez l'homme concernent le paludisme, la trypanosomiase, la tuberculose et les maladies auto-immunes. L'IFI permet le suivi des malades mais doit être réalisée toujours par le même laboratoire compte tenu du manque de reproductibilité d'un laboratoire à l'autre (75).

IFAT, qui utilise généralement l'ensemble des antigènes des promastigotes est hautement spécifique et sensible pour la détection des CanL cliniques, mais, peut manquer de sensibilité pour détecter les chiens cliniquement sains mais infectés (76). Le titre seuil pour distinguer les résultats positifs et négatifs varie du 1:40 à 1:160 entre les différents laboratoires (77).

b. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Dans cette méthode de diagnostic immuno-enzymatique, le fluorochrome de l'IFI est remplacé par une enzyme qui peut agir sur un substrat que l'on rajoute en cours de réaction pour produire une réaction colorée dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'anticorps.

La coloration peut être appréciée à l'oeil nu ou, mieux encore, quantifiée au spectrophotomètre par mesure de l'absorbance limitant ainsi la subjectivité de la lecture (78).

La réaction ELISA possède sur l'IFI plusieurs avantages : mise en oeuvre plus aisée, lecture possible à l'oeil nu, possibilité de n'utiliser qu'une dilution de sérum et sensibilité considérée comme supérieure à l'IFI. En revanche, il est admis que sa spécificité est souvent moins bonne que l'IFI avec des réactions croisées pour la toxoplasmose (79).

Des méthodes plus récentes, versions améliorées de l'ELISA classique, comme le FAST-ELISA ou le DOT-ELISA ayant une sensibilité et une spécificité améliorées se sont hissées au niveau des méthodes de référence. Leur mise en oeuvre plus facile les fait préférer pour l'usage sur le terrain (utilisation de moins d'antigène, diminution des coûts de production, temps de réaction diminué) (80).

Pour l'ELISA, la sensibilité et la spécificité dépendent fortement des antigènes employés, qui comprennent principalement des extraits solubles de promastigotes et de protéines recombinantes ou purifiées (59). Les extraits de parasite entier sont sensibles pour la détection des infections subcliniques ou cliniques canins, mais ont une spécificité légèrement inférieure (71, 76). D'autre part, la technique ELISA avec des peptides recombinants est très spécifique, mais peut manquer de sensibilité pour la

Diagnostic de la leishmaniose canine

détection des chiens infectés cliniquement sains, en fonction de l'antigène employé (72, 76). Un test ELISA à base d'antigènes recombinants (épitopes K9, K26 et K39), a montré une spécificité et une sensibilité élevées chez les chiens infectés (73). Les études évaluant IgG1 et IgG2 utilisant des anticorps polyclonaux ont souvent atteint des résultats contradictoires et ne sont donc pas utilisées en routine dans le diagnostic de CanL (81).

Les Immunochromatographies sont faciles à utiliser et donnent des résultats qualitatifs. Ces kits ont généralement une bonne spécificité mais leur sensibilité est variable et leur performance n'est pas encore optimale (76). Plusieurs kits de tests rapides et des préparations antigéniques pour l'IFAT et ELISA sont également disponibles dans le commerce.

c. Électrosynérèse

C'est une technique moderne d'immunoprécipitation couplée à une électrophorèse ou des antigènes solubles de *Leishmania infantum* réagissant avec les anticorps du sérum à tester provoquent la formation d'arcs de précipitation, qui sont révélés par coloration. (82)

Les sérums à tester sont placés entre des sérums témoins. On observe en cas de positivité une continuité des arcs. Le résultat est donné en nombre d'arcs en continuité avec ceux du témoin positif. Certains arcs peuvent être non spécifiques en cas de maladies auto-immunes ou d'hypérgammaglobulinémie non leishmanienne. La sensibilité de cette méthode est inférieure à celle de l'immunofluorescence. L'électrosynérèse est plus sensible en début de maladie et moins sensible en fin de maladie (83).

La concentration d'anticorps précipitants diminuant avec la thérapeutique spécifique, l'électrosynérèse est donc aussi adaptée au suivi thérapeutique bien que des arcs non spécifiques puissent persister quelquefois et bien qu'elle indique la rechute moins rapidement que l'IFI ou l'ELISA (84).

d. Autres tests d'immunodiagnostic utiles pour le pronostic chez les chiens malades

Les chiens qui ont une infection progressive se manifestant par la maladie ont une réponse cellulaire déprimée aux antigènes *Leishmania* exprimé par aucune réponse cellulaire apparente ou peu de réponse. Les chiens infectés apparemment sains sont considérés comme "résistants" du fait de la présence d'une réponse cellulaire manifeste (23). Le test *in vivo* de peau leishmanine, *in vitro* de stimulation des lymphocytes par l'antigène de

Diagnostic de la leishmaniose canine

Leishmania et la détection de l'IFN-g sont des tests qui évaluent la réponse cellulaire à *Leishmania* et ils pourraient être utilisés pour prédire la susceptibilité ou la résistance à l'infection dans un avenir proche (85). Cependant, ces tests ne sont disponibles que dans les laboratoires de recherche (70). L'utilité clinique de la taille des sous populations de lymphocytes, tels que les CD4 et CD8 dans l'évaluation de la sévérité de l'infection par *Leishmania* et la réponse des chiens à la thérapie est discutable. Une étude récente n'a pas trouvé des différences entre les sous populations lymphocytaires chez les chiens malades, avant et après le traitement antileishmanien par rapport aux chiens en bonne santé (86).

e. Réactions d'agglutination

❖ Hémagglutination indirecte

Les premiers kits sérologiques commercialisés, utilisaient cette technique. Elle est basée sur l'utilisation d'érythrocytes sensibilisées par un antigène leishmanien soluble. La formation d'un anneau ou mieux d'un voile après contact avec des immunoglobulines G (IgG) ou IgM spécifiques signe la positivité. La réaction négative conduit à la sédimentation des globules rouges au fond de la cupule.

Les sensibilité et spécificité de cette méthode sont moins bonnes que celles des techniques précédentes (beaucoup de faux positifs et de faux négatifs en raison de l'apparition tardive des anticorps hémagglutinants, de réactions croisées avec la brucellose, les rickettsioses ou une hémopathie maligne), elle peut être utilisée en pratique courante pour un diagnostic rapide de première intention mais il est préférable de compléter le diagnostic par des méthodes plus fiables (83).

❖ Agglutination directe

C'est une technique basée sur l'agglutination d'antigène sous forme promastigote en présence d'anticorps sériques. Elle nécessite un antigène particulier pouvant prendre deux formes différenciables visuellement selon qu'il est en suspension ou agglutiné.

Cette réaction présente une sensibilité égale à l'IFI et à l'électrosynérèse. Elle se négativera en revanche, plus lentement et persistera souvent après guérison.

L'agglutination directe constitue une bonne méthode de dépistage que l'on peut utiliser dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques. Toutefois, nécessitant une production importante d'antigène, elle peut être difficile de mise en œuvre (87).

Diagnostic de la leishmaniose canine

❖ **Test au latex (agglutination passive)**

C'est une technique récente semblable à l'hémagglutination où les érythrocytes sont remplacés par des billes de latex sensibilisées avec un antigène soluble de *Leishmania infantum*. La relative bonne sensibilité et spécificité de ce test par rapport à l'IFI ou à la ponction ganglionnaire en font un test simple, rapide qui peut être mis en oeuvre en première intention pour des enquêtes de terrain chez l'homme et l'animal (88).

En Algérie, deux enquêtes éco-épidémiologiques ont été réalisées en décembre 1987 et août 1988, en coopération avec l'Institut Pasteur d'Alger, dans la région de Tizi-Ouzou, en Kabylie, dans l'étage climatique sub-humide où l'enzootie leishmanienne est connue de longue date. Dix huit souches de *leishmania infantum* provenant de chiens résidant habituellement en zone rurale ont pu être isolées (89) :

- Trois chez des animaux présentant une positivité au Test au latex et en IFI au titre seuil du 1/ 160,
- Onze chez des chiens ayant un test au latex positif mais une IFI inférieure au titre seuil (un au 1/ 20, sept au 1/ 40 et trois au 1/ 80),
- Quatre obtenues après rétro culture chez des hamsters inoculés avec du suc ganglionnaire prélevé chez des chiens présentant une positivité au Test au latex et en IFI.

Toutes les souches isolées ont été identifiées comme appartenant au zymodème MON-1, à l'exception de deux d'entre elles (MON-77) chez des chiens présentant un Test au latex positif et une IFI au 1/40 (89).

g. Western blot

Le western blot utilise la technique des immunoempreintes. Les différents stades de cette technique sont l'électrophorèse des protéines antigéniques de formes promastigotes de *Leishmania infantum* transfert du profil obtenu sur nitrocellulose, mise en contact de la membrane avec le sérum à tester, élimination des anticorps non spécifiques par lavage et marquage du complexe antigène-anticorps avec des anticorps antiglobulines marqués avec un chromogène. Le stade final consiste en une comparaison entre la bandelette test et un témoin (90).

Tout l'intérêt de cette technique réside dans la mise en évidence d'anticorps spécifiques d'antigènes de *Leishmania infantum*. Il en existe plusieurs qui pourraient être intéressants mais les auteurs divergent ; en ne tenant compte que de seulement ceux pour lesquels il n'existe pas de réactions croisées connues (babésiose, rickettsiose, ehrlichiose...) les antigènes 130, 74, 33, 38, 30, 28,16, 14 kDa se révèlent immunogènes et spécifiques, notamment ceux de 16 et 14 kDa. L'amélioration des

Diagnostic de la leishmaniose canine

sérologies passe par l'utilisation d'antigènes spécifiques purifiés plutôt que d'extraits bruts de *Leishmania infantum* (66).

Le Western-blot accompagné d'études cliniques permet donc de mettre en évidence de nouveaux candidats pour les tests notamment ELISA afin de les rendre plus spécifiques en éliminant la détection des faux positifs (91).

Il a été ainsi possible de mettre au point un test sérologique ELISA avec l'antigène rK 39 de *Leishmania donovani* permettant de corréliser la positivité du test à une infection aigue (92). Le western blot est une technique très sensible qui peut être utilisée pour suivre une séroconversion, dépister les traces d'anticorps sur les porteurs asymptomatiques et dépister de nouveaux réservoirs comme le chat par exemple (66).

Compte tenu de l'imperfection de certaines techniques de mise en évidence indirecte, réactions croisées notamment et pour la mise en place d'un traitement potentiellement néphrotoxique, il est préférable de mettre en évidence directement le parasite (93).

7. Mise en évidence directe du parasite

a. Prélèvement des échantillons

❖ Biopsie cutanée

La peau est soigneusement désinfectée après décapage des croûtes éventuellement présentes. La biopsie est effectuée en marge de la lésion ulcérée, au niveau du bourrelet inflammatoire, à l'aide d'un punch à usage unique. On peut réaliser sur ce prélèvement, un calque cutané sur lame que l'on colorera ensuite mais il est préférable de le mettre en culture après l'avoir laissé pendant 24 h à 4°C dans une solution de sérum physiologique additionnée de pénicilline G à forte concentration afin d'éliminer les contaminations puis de le broyer dans un Potter. Il est important de ne pas dilacérer ni d'épiler le prélèvement car les glandes sébacées et les follicules pileux sont riches en parasites. Lorsque la ponction est réalisée au niveau de zones douloureuses comme le chanfrein ou la truffe, l'animal doit être tranquilisé ou anesthésié (kétamine, diazépam, par voie IV) car l'anesthésie locale est très difficile à réaliser (83).

❖ Ponction de noeuds lymphatiques

Le prélèvement de pulpe des noeuds lymphatiques par ponction nécessite une aiguille 8/10 ou 9/10 et une seringue de 5 ml. Les noeuds lymphatiques explorés sont essentiellement les poplités ou préscapulaires souvent hypertrophiés. Après tonte et désinfection de la zone, le noeud lymphatique est maintenu en position superficielle par la pression des doigts. La perception d'un craquement à la traversée de la capsule conjonctive et la mobilisation latérale de l'aiguille qui entraîne le ganglion confirme la ponction réussie. Le vide partiel dans la seringue étant réalisé dans

Diagnostic de la leishmaniose canine

la seringue en tirant le piston, l'aiguille est déplacée dans plusieurs directions pour dilacérer la pulpe qui se retrouve aspirée (89). Cette pulpe peut être déposée ensuite sur lame pour coloration ou bien mise en culture à condition que le prélèvement ait été effectué de manière quasi stérile et recueilli sur sérum physiologique additionné de pénicilline G.

Cet examen simple pour le praticien permet de mettre facilement en évidence une leishmaniose(94).

❖ **Ponction de moelle osseuse**

Les sites de prélèvement sont fonction de la taille du sujet. Ceux qui sont d'accès le plus facile sont l'épiphyse costale, entre la 6^e et la 9^e cote, zone peu douloureuse, chez les sujets de plus de 6 kg et l'épine iliaque antérosupérieure chez les sujets de moins de 6 kg chez lesquels la table osseuse est beaucoup moins dense.

On utilise une aiguille de 20 mm de long, d'un diamètre de 20/10. L'anesthésie est quelquefois utile pour les sujets nerveux. La ponction est pratiquée en deux temps : traversée de la peau puis de la table osseuse. L'aiguille montée sur une seringue dans lequel le vide partiel est réalisé est implantée obliquement, le biseau vers le haut par une pression modérée mais continue accompagnée d'un léger déplacement latéral. L'apparition d'un liquide sanglant au fond de la seringue indique que la ponction est correctement réalisée. Il peut arriver de collecter un volume important de sang, il faut alors recommencer le prélèvement. Le contenu est déposé puis étalés sur lame et coloré ou mis en culture (95).

❖ **Biopsies de rate ou de foie**

Elles peuvent se pratiquer sur l'animal couché sur le côté droit ou sur le dos. La ponction est ensuite mise en culture ou traitée par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). L'opportunité de ces ponctions en clientèle vétérinaire est discutable compte tenu du risque d'hémorragie important et de la surveillance ultérieure du chien trop délicate à effectuer (96).

b . Culture

Les prélèvements de tissus ou d'organes peuvent être mis en culture après prélèvement stérile sur sérum physiologique additionné de 125 000 UI/ml de pénicilline G soit sur milieu de culture, soit directement sur animal de laboratoire (souris, hamster,...).

❖ **Milieus de culture NNN et CCS**

Le milieu NNN (Novy-Mac Neal-Nicolle) réalisé avec gélose et sang de lapin se prête parfaitement à l'isolement et au maintien *in vitro* de *Leishmania*. Il peut aussi servir pour la cryoconservation et l'expédition des souches.

Diagnostic de la leishmaniose canine

La température d'incubation des milieux est **primordiale**, elle doit être comprise entre 22°C et 26°C. Cette exigence ne pose pas de problème dans le laboratoire mais sur le terrain, il est souvent difficile de maintenir cette fourchette de température surtout dans les pays chauds d'endémie

leishmanienne (Soudan, Yémen, Liban...). La maîtrise de la chaîne du froid (thermosondes, systèmes réfrigérants, surveillance constante jour et nuit) est donc primordiale dans l'isolement de nouvelles souches(97).

Le milieu CCS (coeur-cerveau-sang) est quant à lui essentiellement utilisé pour la préparation des extraits en vue de l'identification enzymatique. Il permet en outre la préparation d'antigènes figurés pour l'IFI et solubles pour les techniques d'électrosynérèse et ELISA.

❖ Technique d'inoculation sur animal :

Le hamster ou les muridés peuvent être inoculé par voie péritonéale ou voie sous-cutanée. Le chien peut aussi être utilisé ; l'inoculation se fait alors par voie intradermique (au niveau de la truffe) intraveineuse ou intrapéritonéale (89).

Il est important de changer d'aiguille entre le prélèvement et l'inoculation. Les animaux sont ensuite sacrifiés, autopsiés et des prélèvements d'organes sont réalisés (rate, foie, moelle osseuse) pour mise en évidence, culture sur milieu NNN après broyage si nécessaire, et identification du parasite. La longue période d'incubation (délai moyen de trois à six mois) rend inutile en pratique l'inoculation dans un but simplement diagnostique. En revanche, elle peut être un moyen de conservation de souches pour identification ultérieure (96).

c. Identification des parasites :

❖ Coloration

Elle doit s'effectuer avec un matériel adapté. Les lames doivent être parfaitement dégraissées dans un mélange alcool-éther

Les colorations sont réalisées selon les techniques utilisées en hématologie du type May-Griinwald-Giemsa. On peut avoir recours aux colorations rapides à condition qu'elles soient de bonne qualité car la coloration est un élément de bonne identification.

Le microscope doit être de qualité convenable et propre. La recherche se fait habituellement au grossissement 400 pour détecter les éléments indicateurs et au 1000 pour identifier les parasites. Compte tenu du faible nombre de leishmanies potentiellement observables, l'examen doit être réalisé avec méthode et patience sur au moins 1000 champs différents. Les calques ont sur les frottis l'avantage de conserver intacte la structure des macrophages et d'éviter ainsi la dissémination des parasites sur la lame

Diagnostic de la leishmaniose canine

L'identification des leishmanies est réalisée par la mise en évidence d'éléments de 2 à 6 μm , ovoïdes ou ellipsoïdes au contenu caractéristique : un noyau plus ou moins granuleux et un kinétoplaste souvent de couleur plus foncée et en forme de bâtonnet souvent perpendiculaire au noyau (94).

❖ **Mise en évidence des antigènes leishmaniens**

Les techniques immunologiques utilisées pour la sérologie, comme l'ELISA par exemple, peuvent servir à la détection d'antigènes circulants de *Leishmania infantum*. Plusieurs auteurs ont essayé ainsi de mettre en évidence l'intérêt de la détection d'un antigène circulant de poids moléculaire 51 kDa mais il n'a pas été montré pour l'instant d'intérêt épidémiologique à la mise en évidence de cet antigène (91).

La détection des antigènes reste cependant une voie à explorer car elle peut s'affranchir de toutes les imprécisions des techniques de mise en évidence indirecte et sera sans aucun doute la technique de l'avenir, à l'instar de ce qui se passe en virologie (98).

❖ **Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

PCR ont grandement amélioré la sensibilité du diagnostic parasitologique dans la leishmaniose canine. La détection de l'ADN spécifique du parasite dans les tissus par PCR permet un diagnostic sensible et spécifique. Plusieurs essais différents avec des séquences cibles différentes en utilisant l'ADN génomique ou kinétoplastique (ADNk) ont été développés pour CanL. Les analyses basées sur ADNk semblent être les plus sensibles pour la détection directe dans les tissus infectés (99). La PCR peut être effectuée sur l'ADN extrait des tissus, du sang, des liquides biologiques ou même à partir de spécimens histopathologiques. La PCR sur la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques, la rate ou la peau est plus sensible et spécifique pour le diagnostic de CanL (100, 101,102) La PCR sur sang total, leuco-plaquettaire, et l'urine est moins sensible que les tissus susmentionnés (103,101). L'échantillonnage non invasif utilisant des écouvillons conjonctivaux s'est avérée être très sensible et spécifique pour la détection de *L. infantum* dans des groupes de chiens séropositifs avec la leishmaniose cliniques (104). La PCR sur ponctions des ganglions lymphatiques et la moelle osseuse a été montrée pour être plus sensible que la détection microscopique des amastigotes dans les frottis colorés ou de culture de parasites (58). Actuellement, trois différentes techniques de PCR sont disponibles: PCR conventionnelle, PCR nichée et la PCR en temps réel (59,70,99) Quantitative PCR en temps réel est une technique avancée qui permet de détecter des charges parasitaires extrêmement faibles par rapport à la PCR conventionnelle (105).

Diagnostic de la leishmaniose canine

La PCR en temps réel permet la quantification des charges de *Leishmania* dans les tissus de chiens infectés, ce qui est important pour le diagnostic ainsi que pour le suivi pendant le traitement de CanL (101,106). Il est important de souligner que les informations fournies par PCR ne doivent pas être séparées des données obtenues à partir de la clinique et les évaluations sérologiques. Celles-ci doivent toutes être combinées ensemble pour une évaluation complète.

❖ **L'utilisation de la PCR chez les chiens infectés apparemment sains**

La présence d'ADN de *Leishmania* dans le sang ou d'autres tissus de chiens apparemment sains vivant dans les zones endémiques indique que ces chiens sont porteurs de l'infection (29) mais, ils peuvent ne jamais développer la maladie clinique. L'interprétation des résultats de la PCR doit être effectuée avec prudence chez les chiens cliniquement sains en tenant compte du but de la procédure de diagnostic. Par exemple, dans le but d'identifier des chiens infectés et d'empêcher leur importation à des zones non endémiques où l'infection peut se propager par des vecteurs locaux phlébotome, ou dans le but de prévenir la transmission de l'infection par les produits sanguins provenant de donneurs infectés, la PCR serait une technique appropriée en combinaison avec des tests sérologiques quantitatifs. Cependant, la décision de traiter les chiens cliniquement sains avec des médicaments anti-leishmanies basés sur une PCR positive seule n'est pas recommandée (69).

❖ **Identification enzymatique**

L'analyse des isoenzymes par électrophorèse est très souvent utilisée et représente actuellement la méthode de référence d'identification des leishmanies. Elle consiste en l'analyse électrophorétique de 15 systèmes enzymatiques. Les souches présentant un même profil enzymatique (électromorphe) sont regroupées dans un même zymodème ou unité taxonomique (MON-1 par exemple). Les foyers français de leishmanioses viscérales humaine et canine sont dus ainsi à des zymodèmes de *Leishmania infantum* très proches de la souche de référence MON 1 (106). La collecte dans le monde entier de prélèvements humains et animaux a permis au Centre international de cryoconservation, d'identification enzymatique et d'étude taxonomique des *Leishmania* (Montpellier) d'isoler et d'identifier 266 zymodèmes différents.

L'intérêt pour le clinicien, de cette méthode taxonomique permanente, peut sembler limité même si elle permet souvent l'adoption de conduites thérapeutiques adaptées. L'identification précise et rigoureuse d'isolats de *Leishmania* a surtout permis d'établir une classification cohérente du genre *Leishmania* et de connaître la structure et le fonctionnement (réservoirs, cycle de transmission...) des divers foyers de leishmaniose dans le monde (107).

Diagnostic de la leishmaniose canine

Tableau 1. Comparaison des différents tests de laboratoire pour le diagnostic de la Leishmaniose canine.

Test	Avantages	L'examen microscopique		Recommandations	Références
Echantillons de tissus tachés par la cytologie (ganglions lymphatiques, la moelle osseuse, la rate et la peau)	Définitives	Temps; dépend de l'expérience de l'examinateur; faible sensibilité chez les chiens asymptomatiques	Pour le diagnostic de la maladie symptomatique suspectée	[58, 67, 69, 108]	
L'immunohistochimie des échantillons de tissus histopathologie.	Sensible à une maladie symptomatique	Pas largement disponibles	Pour le diagnostic des lésions compatibles quand est évident par histopathologie	[58,109]	
Parasite de la culture des tissus	Spécifiques	Ne convient pas pour le diagnostic rapide	Pour la recherche et des espèces et / ou de la souche de détermination	[68,69,110]	
Conventionnel et PCR					
TST (ADN génomique)	permet de déterminer les espèces d'ulcéreuses RFLP Sensible à la rate et des ganglions lymphatiques aspire;	Faible sensibilité de sang	Pour le diagnostic lors de spéciation <i>Leishmania</i> est important	[68,111,112]	
ADNk	Sensible aux ganglions lymphatiques, la moelle osseuse et la rate	Non spécifique pour <i>L. infantum</i>	Convient pour le diagnostic de routine	[58,111,112]	

Diagnostic de la leishmaniose canine

Quantitative PCR en temps réel (ADNk)

	Les plus sensibles; utile pour la détection dans le sang; permet une quantification des parasites	Pas largement disponibles; pas spécifique pour <i>L. infantum</i>	Pour le diagnostic à partir de sang ou d'autres tissus; utile pour le suivi de la réponse au traitement	[105,113]
Sérologie Qualitative				
Appareils immunochromatographique	Un diagnostic rapide sur place	Faible sensibilité à l'infection asymptomatique; non quantitative	Faible valeur prédictive négative	[76,77]
Quantitative Sérologie				
IFAT	Sensible à une maladie symptomatique	Faible sensibilité à l'infection asymptomatique; pourrait provoquer une réaction croisée avec <i>Trypanosoma cruzi</i>	Très utile pour le diagnostic de la maladie symptomatique suspectée ou chiens asymptomatiques progresser vers elle	[67,69, 71, 76,77,114]
ELISA avec de l'extrait soluble dans promastigotes	Sensible à une maladie symptomatique	Faible sensibilité à l'infection asymptomatique	Très utile pour le diagnostic de la maladie symptomatique suspectée	[51, 58, 67, 68,71, 76,115]
Polypeptides recombinants	Spécifiques	Sensibilité variable chez les chiens asymptomatiques, selon l'antigène	Utiles pour le diagnostic de la maladie symptomatique suspectée et pour diminuer l'effet de réactivité croisée avec <i>T. cruzi</i>	[114,115]
DAT	Bon degré de sensibilité	Résultats prendre 18 h	Utile pour les études épidémiologiques	[71]

Abréviations: DAT, test d'agglutination directe; /ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay / IFAT, le test d'immunofluorescence; / ITS1, espaceur transcrit interne 1/N ADNk, kinétoplaste l'ADN / RFLP, polymorphisme de longueur des fragments de restriction

1. Mise à jour sur la thérapie

Bien que d'importantes percées ont été faites dans le diagnostic et le contrôle de la leishmaniose canine ces dernières années, les progrès dans le traitement de la maladie reste à la traîne. Plusieurs médicaments utilisés pour la thérapie de la maladie sont en mesure d'améliorer temporairement les signes cliniques ou de guérir des chiens cliniquement, mais aucun de ces traitements n'élimine de manière fiable l'infection (116). Alors que les protocoles de traitement et une surveillance clinique ont considérablement changé, les médicaments de base utilisé pour la thérapie de la maladie sont restés les mêmes, malgré les efforts pour améliorer les formulations et les propriétés pharmacocinétiques. Plusieurs nouveaux médicaments ont été évalués pour la thérapie de leishmaniose canine, mais elles ont surtout suggéré que des ajouts soient administrés en association avec les médicaments de base ou comme une thérapie de deuxième ligne pour les chiens qui ne répondent pas bien aux autres médicaments.

Les progrès dans le diagnostic de la maladie et l'insuffisance rénale chronique causée par la leishmaniose canine ont permis la prise en charge précoce de l'insuffisance rénale et l'amélioration du taux de récupération de la maladie clinique (41). Cependant, les chiens traités continuent de nourrir l'infection et d'être infectieux pour les phlébotomes (113,117,118). Les médicaments les plus couramment utilisés pour le traitement de la leishmaniose canine sont les pentavalents d'antimoine antimoniate de méglumine, qui inhibe sélectivement la glycolyse et l'oxydation des acides gras, et l'allopurinol, qui inhibe la synthèse protéique en interférant avec la synthèse de l'ARN. Ces deux médicaments sont fréquemment utilisés en combinaison. Les études sur les traitements avec chacun de ces médicaments, seuls ou en association, ont démontré que la plupart des animaux traités guérissent cliniquement, mais restent porteurs du parasite et pourraient rechuter (113, 117, 118). L'amphotéricine B, qui agit en se liant à l'ergostérol dans la membrane cellulaire du parasite et de modifier sa perméabilité, est également utilisé, mais il est néphrotoxique et pourrait mettre en danger les chiens avec une leishmaniose canine qui ont déjà une pathologie rénale. D'autres médicaments auraient une certaine efficacité contre la leishmaniose canine incluant la pentamidine, miltéfosine, aminosidine (paramomycine), le kétoconazole, le métronidazole avec la spiramycine et métronidazole avec enrofloxacin (116,119,120). Ils sont actuellement considérées comme des médicaments de deuxième ligne, et des études cliniques plus étendues sont nécessaires pour vérifier leur efficacité thérapeutique.

Le potentiel zoonotique de la leishmaniose canine, l'absence de guérison parasitologique, et les cas signalés de résistance du parasite à l'antimoine pentavalent, l'amphotéricine B, lamiltéfosine et l'aminosidine (121) indiquent qu'il serait préférable d'éviter ou de minimiser l'utilisation des mêmes médicaments pour la thérapie des leishmanioses canine et humaines. Les nouveaux médicaments

qui appartiennent à différentes classes devraient être développées pour atteindre la guérison clinique ou une rémission, en plus d'éliminer l'infection.

2. Le développement de vaccins

Une vaccination efficace contre la leishmaniose canine peut prévenir la maladie chez les chiens et constitue une stratégie importante pour diminuer le risque d'infection pour les humains. Après des décennies de tentatives de productions de vaccins sûrs et efficaces avec un succès limité, les vaccins nouvellement développés sont actuellement en phases progressives d'essais cliniques sur le terrain, et une marque est autorisée pour une utilisation commerciale au Brésil (122,123). L'adjuvant ajouté au vaccin *Leishmania* joue un rôle majeur dans la reconnaissance par le système immunitaire de l'antigène. Ainsi, le choix de l'adjuvant est extrêmement important dans la vaccination contre la leishmaniose canine. Quatre classes de vaccins anti-*Leishmania* ont été évaluées chez les chiens. Des vaccins tués composés de promastigotes inactivés (124,125). Un essai clinique utilisant le merthiolate avec des promastigotes modifiés de *Leishmania braziliensis* par le bacille de Calmette-Guérin (BCG) comme adjuvant a montré une bonne protection contre l'inoculation par voie intraveineuse de *L. infantum* (124). Plus récemment, il a été démontré que la modification de *Leishmania major* autoclavé + BCG par adsorption à l'alun augmentait de façon significative l'immunogénicité. Le suivi sérologique pendant 16 mois de chiens vaccinés, a montré une réduction de 69% du taux de séroconversion par rapport aux témoins (126). Les fractions purifiées des vaccins à *Leishmania*, comprennent des composants de l'ensemble des parasites en culture ou des macromolécules de leur excrétion-sécrétion (ES). Le principal représentant de ce groupe d'antigènes est la glycoprotéine GP63 fraction enrichie, aussi connu comme le «ligand du mannose fucose» (FML), de *Leishmania donovani*. Un vaccin à base de FML a été évalué au Brésil dans trois études sur le terrain (122, 127, 128) de 24, 48 et 11 mois, respectivement. Elle a montré un taux d'efficacité des vaccins de 80% (122) et a été autorisée au Brésil comme le premier vaccin commercial pour la leishmaniose canine (Leishmune1). Le vaccin contre la FML a également été proposé pour la thérapie immunitaire des chiens infectés et un vaccin bloquant la transmission (128,129). Cependant, la différenciation naturellement infectés et vaccinés FML-chiens est difficile et a conduit à la réticence de l'utilisation de ce vaccin chez certains vétérinaires au Brésil, où les chiens séropositifs sont abattus (130). De plus, pour une évaluation critique de ce vaccin, des données sont nécessaires sur les effets directs de la vaccination par le FML sur la réduction de l'infectiosité des chiens vaccinés aux phlébotomes et sur la réduction de la maladie dans les populations humaines dans les régions où les chiens ont été vaccinés. Un second vaccin basé sur les fractions purifiées du parasite a été étudié en France, où une bonne

protection contre l'infection expérimentale à *L. infantum* a été obtenue. Ce vaccin contient un antigène ES purifiée à partir de surnageant de culture de promastigotes de *L. infantum* (LiESAp) avec muramyldipeptide comme adjuvant (123). L'évaluation du vaccin LiESAp pour prévenir l'infection naturelle dans un essai sur le terrain en double aveugle a indiqué un taux d'efficacité élevé (131). Les antigènes recombinants de *Leishmania* sont constitués de protéines immunogènes dérivées de gènes de *Leishmania* clonés et purifiés à partir de vecteurs d'expression transfectés. Un vaccin basé sur un recombinant polyprotéinique *Leishmania* connu comme Leish-111f a échoué à prévenir l'infection et la progression de la maladie chez les chiens vaccinés (133).

Les vaccins à ADN contre la leishmaniose canine comprennent une alternative à la vaccination avec des antigènes protéiques. Un essai de vaccination a été réalisé dans deux groupes de chiens à l'aide d'un plasmide portant le gène de l'antigène MANQUE (ADN) ou l'ADN MANQUE suivi d'un rappel du vaccin du virus recombinant contenant le même gène. Une protection de 60% des chiens a été obtenue dans le deuxième groupe après 17 mois de suivi (133). Une deuxième étude a employé une combinaison de l'ADN et de protéines d'immunisation avec *L. infantum* cystéine protéinases de type I (CPB) et de type II (CPA). Après 12 mois de suivi, la moelle osseuse de dix chiens vaccinés a été négative pour les amastigotes de *Leishmania* (134). Une étude supplémentaire avec l'ADN plasmidique codant pour quatre protéines multiantigéniques n'a pas réussi à démontrer une protection expérimentale contre *L. infantum* (135).

Bien que des progrès ont été réalisés dans la vaccination de la leishmaniose canine dans la dernière décennie, le défi de produire des vaccins optimaux contre cette maladie n'a pas été relevé et d'autres recherches sont nécessaires pour identifier les cibles vaccinales et adjuvants immuno-stimulants.

3. Prévention et contrôle des vecteurs

La prévention contre les piqûres de phlébotomes brise le cycle de transmission de *Leishmania* et empêche l'infection. Plusieurs composés chimiques ont montré un effet répulsif ou insecticide sur les phlébotomes avec un degré variable d'efficacité (136,137), qui dépend de facteurs tels que le mode d'action des insecticides, la capacité à se propager et rester soutenue dans la peau et la sensibilité spécifique de la morsure des vecteurs. Les pyréthriinoïdes sont actuellement les insecticides les plus utilisés en raison de leur efficacité contre les phlébotomes et de leur faible toxicité pour l'hôte canin.

Il a été démontré que les colliers pour chien imprégnés de deltaméthrine possédaient des effets répulsifs et insecticides contre les phlébotomes ; les effets des colliers durent plus de six mois (136). Les colliers de deltaméthrine sont efficaces contre une variété de d'espèces de phlébotomes dans des environnements différents en Europe, en Asie et en Amérique du Sud (138,139). Un essai

Traitement et prophylaxie

randomisé sur un cluster en provenance d'Iran a indiqué que l'intervention et le contrôle par les colliers de chiens dans des villages ont considérablement réduit la survenue de la séroconversion chez les chiens et chez les enfants vivant dans les villages d'intervention (140). Cette étude a prouvé que la protection d'une proportion majeure de la population canine dans un foyer endémique avec un insecticide est efficace pour réduire l'infection chez les humains.

L'application de spot-on et les pulvérisations d'autres pyréthriinoïdes ont également été signalés efficaces contre les phlébotomes, mais pour des durées plus courtes que les colliers (141). La combinaison de pulvérisation de perméthrine et de pyriproxifène a une activité répulsive immédiate et protège pour plus de 21 jours (142), et la combinaison de perméthrine et d'imidaclopride a un effet répulsif qui commence 24 heures après l'application et dure au moins 21 jours (143, 137). Le spot-on à la combinaison perméthrine-imidaclopride a réussi à protéger les chiens de chenil dans le sud de l'Italie contre la leishmaniose canine lorsqu'il est appliqué toutes les deux semaines (143). La protection avec des insecticides topique est donc un outil précieux qui pourrait être intégré avec succès dans les programmes de contrôle de la leishmaniose canine et utilisé en plus de la vaccination.

L'utilisation périodique des médicaments contre la leishmaniose pour la prévention de la transmission n'a pas fait ses preuves. L'administration quotidienne de l'allopurinol pendant une semaine tous les mois pour les chiens dans une étude de terrain contrôlée dans une zone endémique en Grèce n'a pas non plus empêché de nouvelles infections à *L. infantum* ou l'évolution de l'infection existante chez les autres chiens vers l'expression clinique (144). D'autres essais évaluant l'infectiosité des chiens leishmaniens pour les phlébotomes après traitement ont constaté que, bien que l'infectiosité puisse diminuer temporairement, elle fini par reprendre (145).

Des mesures de contrôle supplémentaires contre la leishmaniose visent les vecteurs dans les chenils et les maisons comprenant la pulvérisation les fenêtres de protection, les portes, les filets de chenil, et les rideaux traités aux pyréthriinoïdes résiduelles (146).

Conclusion

Il est essentiel de choisir les analyses les plus intéressantes en fonction :

- ❖ de l'utilisation du test : diagnostic de la maladie ou enquête épidémiologique ;
- ❖ de la zone d'exercice : en zone d'endémie il est important de choisir des méthodes très sensibles pour éviter les faux positifs ;
- ❖ du coût ;
- ❖ et du stade de la maladie : la PCR permet une détection plus précoce que l'apparition des anticorps et induit moins de faux positifs (147).

Les divers examens spécifiques peuvent être utilisés selon deux objectifs :

Si l'on souhaite confirmer une suspicion clinique (notamment en zone d'enzootie) il faut :

Tenter une observation directe au microscope à partir de calques cutanés, d'adénogramme ou de myélogramme.

- Si des éléments parasitaires sont présents, le diagnostic est posé;
- si le parasite n'a pas été isolé, effectuer une sérologie à partir de sang prélevé sur tube sec ; il est préférable d'associer deux tests (ELISA et IFI);
- si ces analyses sont négatives mais que la suspicion clinique demeure, envisager une PCR réalisée sur un prélèvement de noeud lymphatique ou, à défaut, du sang.

Si l'on souhaite contrôler un animal ne présentant pas de symptômes, il faut :

- Faire un contrôle sérologique environ 2 mois après la période de contamination,
- ou une PCR très sensible à la fin de la saison de contamination (148).

Les méthodes sérologiques de diagnostic reflètent l'installation d'une réponse immunitaire suite à l'infection par les leishmanies. Cette réponse immunitaire est plus ou moins protectrice contre la maladie.

Le contrôle futur de la leishmaniose passe par une approche intégrée de prévention dans laquelle est incluse une vaccination efficace, l'utilisation de collier à base de deltaméthrine ou un autre insecticide topique efficace. Ces derniers permettent d'empêcher les nouvelles infections et de réduire la prise des repas des vecteurs sur des chiens déjà infectés alors que la première permet de prévenir l'établissement de l'infection. Enfin, des efforts doivent être mis en oeuvre afin d'éviter l'introduction de la maladie dans des zones connues pour être encore indemnes à ce jour à l'aide de tests lors de l'introduction d'animaux sur ces territoires et de contrôle rigoureux de la circulation des animaux, notamment ceux en provenance des zones à risque.

Références

- [1] **MEUNIER A (2007)** Etude épidémiologique de la leishmaniose canine et de l'influence des facteurs environnementaux (en France depuis 1965, dans le sud-ouest en (2006). Thèse Méd. Vét., Lyon, 106p.
- [2] **Desjeux, P (2004)**. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp.Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 305–318.
- [3] **HARRAT Z, ADDADI K, BELKAID M, TABET-DERRAZ O (1992)**. La leishmaniose viscérale en Algérie. Recensement des cas de leishmaniose viscérale. *Bull Soc Pathol Exot*; 85 : 296-301.
- [4] **Murray H.W., Berman J.D., Davies C.R., Saravia N.G (2005)**. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366: 1561-1577.
- [5] **Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C (2006)**. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 22, 552–557
- [6] **Gramiccia, M., Gradoni, L (2005)**. The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *Int. J. Parasitol.* 35, 1169–1180.
- [7] **Martin-Sanchez, J., Acedo, C., Munoz-Perez, M., Pesson, B., Marchal, O, Morillas-Marquez, F., (2007)**. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet. Parasitol.* 145, 267–273.
- [8] **Sobrino, R., Ferroglio, E., Oleaga, A., Romano, A., Millan, J., Revilla, M., Arnal, M.C., Trisciuglio, A., Gortazar, C (2008)** . Characterization of widespread canine leishmaniasis among wild carnivores from Spain. *Vet. Parasitol.* 155, 198–203.
- [9] **Fernandez-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., (2006)**. Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Vet. Parasitol.* 135, 181–185.
- [10] **BUSSIÉRAS J, CHERMETTE R (1992)** Parasitologie vétérinaire. Fascicule 2. Protozoologie. Polycopié. Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Service de Parasitologie. 186p.
- [11] **EUZEBY J (2008)** Grand dictionnaire illustré de parasitologie médicale et vétérinaire. Paris : Lavoisier, 818p.
- [12] **SLAPPENDEL RJ, FERRER L (1998)** Leishmaniasis. In : GREENE CE, editor. *Infectious diseases of the dog and the cat.* 2nd ed. Philadelphia : WB Saunders, 450-456.
- [13] **FERRER LM (1999)** Clinical aspects of canine leishmaniasis. In : *Canine leishmaniasis : an update.* Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 6-9.
- [14] **KILLICK-KENDRICK R et M. (1999)** Biology of sandfly vectors of Mediterranean canine leishmaniasis. In : *Canine leishmaniasis : an update.* Barcelona, Spain, 1999. Wiesbaden : Hoechst Roussel Vet, 26-31.

- [15] Sharma, U., Singh, S., (2008). Insect vectors of Leishmania: distribution, physiology and their control. *J. Vector Borne Dis.* 45, 255–272.
- [16] Shaw, S.E., Lerga, A.I., Williams, S., Beugnet, F., Birtles, R.J., Day, M.J., Kenny, M.J., (2003) . Review of exotic infectious diseases in small animals entering the United Kingdom from abroad diagnosed by PCR. *Vet. Rec.* 152, 176–177.
- [17] Teske, E., van Knapen, F., Beijer, E.G., Slappendel, R.J., (2002) . Risk of infection with *Leishmania* spp. in the canine population in the Netherlands. *Acta Vet. Scand.* 43, 195–201.
- [18] Maroli, M., Rossi, L., Baldelli, R., Capelli, G., Ferroglia, E., Genchi, C., Gramiccia, M., Mortarino, M., Pietrobelli, M., Gradoni, L (2008). The northward spread of leishmaniasis in Italy: evidence from retrospective and ongoing studies on the canine reservoir and phlebotomine vectors. *Trop. Med. Int. Health* 13, 256–264.
- [19] Gavgani, A.S., Mohite, H., Edrissian, G.H., Mohebali, M., Davies, C.R., (2002). Domestic dog ownership in Iran is a risk factor for human infection with *Leishmania infantum*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 67, 511–515.
- [20] Dantas-Torres, F., (2006). Presence of *Leishmania* amastigotes in peritoneal fluid of a dog with leishmaniasis from Alagoas, Northeast Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 48, 219–221.
- [21] Nunes, C.M., Lima, V.M., Paula, H.B., Perri, S.H., Andrade, A.M., Dias, F.E., Burattini, M.N., (2008) . Dog culling and replacement in an area endemic for visceral leishmaniasis in Brazil. *Vet. Parasitol.* 153, 19–23.
- [22] Ferrer, L., Rabanal, R., Fondevila, D., Ramos, J.A., Domingo, M., (1988) . Skin lesions in canine leishmaniasis. *J. Small Anim. Pract.* 29, 381–388.
- [23] Baneth, G., Koutinas, A.F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., Ferrer, L., (2008). Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol.* 24, 324–330
- [24] Mancianti, F., Gramiccia, M., Gradoni, L., Pieri, S., (1988). Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 82, 566–567
- [25] Solano-Gallego, L., Baneth, G., (2008). Canine leishmaniasis—a challenging zoonosis. *Eur. J. Comp. Anim. Pract.* 18, 232–241.
- [26] Bottero, E., Poggi, M., Viglione, M., (2006). Lesioni papulari indotte da *Leishmania* spp in 8 cani giovani. *Veterinaria* 1, 33–36.
- [27] Ordeix, L., Solano-Gallego, L., Fondevila, D., Ferrer, L., Fondati, A., (2005). Papular dermatitis due to *Leishmania* spp. infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet. Dermatol.* 16, 187–191.

- [28] Costa, F.A., Goto, H., Saldanha, L.C., Silva, S.M., Sinhorini, I.L., Silva, T.C., Guerra, J.L., (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.* 40, 677–684.
- [29] Solano-Gallego, L., Lull, J., Ramos, G., Riera, C., Arboix, M., Alberola, J., Ferrer, L., (2000). The Ibiza hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet. Parasitol.* 90, 37–45.
- [30] Franca-Silva, J.C., da Costa, R.T., Siqueira, A.M., Machado-Coelho, G.L., da Costa, C.A., Mayrink, W., Vieira, E.P., Costa, J.S., Genaro, O., Nascimento, E., (2003) . Epidemiology of canine visceral leishmaniosis in the endemic area of Montes Claros Municipality, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 111, 161–173.
- [31] Sanchez-Robert, E., Altet, L., Utzet-Sadurni, M., Giger, U., Sanchez, A., Francino, O., (2008) . *Slc11a1* (formerly *Nramp1*) and susceptibility to canine visceral leishmaniasis. *Vet. Res.* 39, 36.
- [32] Cardoso, L., Rodrigues, M., Santos, H., Schoone, G.J., Carreta, P., Varejao, E., van Benthem, B., Afonso, M.O., Alves-Pires, C., Semiao-Santos, S.J., Rodrigues, J., Schallig, H.D., (2004) . Sero-epidemiological study of canine *Leishmania* spp. infection in the municipality of Alijo (Alto Douro, Portugal). *Vet. Parasitol.* 121, 21–32.
- [33] Travi, B.L., Osorio, Y., Melby, P.C., Chandrasekar, B., Arteaga, L., Saravia, N.G., (2002). Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect. Immun.* 70, 2288–2296.
- [34] Miro' , G., Galvez, R., Mateo, M., Montoya, A., Descalzo, M.A., Molina, R., (2007). Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.* 143, 375–379.
- [35] Zivcinkjak, T., Martinkovic, F., Marinculic, A., Mrljak, V., Kucer, N., Matijatko, V., Mihaljevic, Z., Baric-Rafaj, R., (2005). A seroepidemiologic survey of canine visceral leishmaniosis among apparently health dogs in Croatia. *Vet. Parasitol.* 131, 35–43.
- [36] Koutinas, A.F., Polizopoulou, Z.S., Saridomichelakis, M.N., Argyriadis, D., Fytianou, A., Plevraki, K.G., (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35, 376–383.
- [37] Blavier, A., Keroack, S., Denerolle, P., Goy-Thollot, I., Chabanne, L., Cadore, J.L., Bourdoiseau, G., (2001). Atypical forms of canine leishmaniosis. *Vet. J.* 162, 108–120.
- [38] Papadogiannakis, E.I., Koutinas, A.F., Saridomichelakis, M.N., Vlemmas, J., Lekkas, S., Karameris, A., Fytianou, A., (2005). Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 104, 227–237.

- [39] IRIS, (2006) IRIS staging of chronic renal disease (International Renal Interest Society. http://www.iris-kidney.com/guidelines/en/staging_ckd.shtml).
- [40] Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R., Tarducci, A., Guarraci, A., (2003). Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms. *Am. J. Vet. Res.* 64, 558–561
- [41] Plevraki, K., Koutinas, A.F., Kaldrymidou, H., Roumpies, N., Papazoglou, L.G., Saridomichelakis, M.N., Savvas, I., Leondides, L., (2006) . Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 20, 228–233.
- [42] Pena, M.T., Roura, X., Davidson, M.G., (2000) . Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993–1998). *Vet. Ophthalmol.* 3, 35–41.
- [43] Naranjo, C., Fondevila, D., Leiva, M., Roura, X., Pena, T., (2005). Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 133, 37–47.
- [44] Cortadellas, O., Del Palacio, M.J., Bayon, A., Albert, A., Talavera, J., (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 941–947.
- [45] Pena, M.T., Naranjo, C., Klauss, G., Fondevila, D., Leiva, M., Roura, X., Davidson, M.G., Dubielzig, R.R., (2008). Histopathological features of ocular leishmaniosis in the dog. *J. Comp. Pathol.* 138, 32–39.
- [46] Rallis, T., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Adamama-Moraitou, K.K., Papazoglou, L., Fytianou, A., Koutinas, A.F., (2005). Chronic hepatitis associated with canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*): a clinicopathological study of 26 cases. *J. Comp. Pathol.* 132, 145–152
- [47] Adamama-Moraitou, K.K., Rallis, T.S., Koutinas, A.F., Tontis, D., Plevraki, K., Kritsepi, M., (2007). Asymptomatic colitis in naturally infected dogs with *Leishmania infantum*: a prospective study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 53–57.
- [48] Vamvakidis, C.D., Koutinas, A.F., Kanakoudis, G., Georgiadis, G., Saridomichelakis, M., (2000). Masticatory and skeletal muscle myositis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Vet. Rec.* 146, 698–703.
- [49] Ciaramella, P., Oliva, G., Luna, R.D., Gradoni, L., Ambrosio, R., Cortese, L., Scalone, A., Persechino, A., (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. Rec.* 141, 539–543.

- [50] Petanides, T.A., Koutinas, A.F., Mylonakis, M.E., Day, M.J., Saridomichelakis, M.N., Leontides, L.S., Mischke, R., Diniz, P., Breitschwerdt, E.B., Kritsepi, M., Garipidou, V.A., Koutinas, C.K., Lekkas, S., (2008). Factors associated with the occurrence of epistaxis in natural canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J. Vet. Intern. Med.* 22, 866–872.
- [51] Solano-Gallego, L., Fernandez-Bellon, H., Morell, P., Fondevila, D., Alberola, J., Ramis, A., Ferrer, L., (2004). Histological and immunohistochemical study of clinically normal skin of *Leishmania infantum*-infected dogs. *J. Comp. Pathol.* 130, 7–12.
- [52] Mylonakis, M.E., Papaioannou, N., Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Billinis, C., Kontos, V.I., (2005). Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Vet. Clin. Pathol.* 34, 243–247.
- [53] Barrouin-Melo, S.M., Larangeira, D.F., Santos, S.O., Chagas-Junior, A.D., Paixao, M., Aguiar, P.H., dos-Santos, W.L., Pontes-de-Carvalho, L., (2006). A standardized cytological and immunochemical method for the analysis of fine-needle spleen aspirates: assessment of leukocyte population changes in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111, 251–261
- [54] Giunchetti, R.C., Martins-Filho, O.A., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Marques, M.J., Tafuri, W.L., Correa-Oliveira, R., Reis, A.B., (2008) . Histopathology, parasite density and cell phenotypes of the popliteal lymph node in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 121, 23– 33.
- [55] Steurer J, Fischer JE, Bachmann LM, Koller M, ter Riet G. (2002) Communicating accuracy of tests to general practitioners: a controlled study. *BMJ*; 324: 824–6
- [56] Mayer D. (2004) .Essential evidence based medicine. Cambridge: Cambridge University Press,
- [57] Agut, A., Corzo, N., Murciano, J., Laredo, F.G., Soler, M., (2003). Clinical and radiographic study of bone and joint lesions in 26 dogs with leishmaniasis. *Vet. Rec.* 153, 648–652.
- [58] Moreira, M.A., Luvizotto, M.C., Garcia, J.F., Corbett, C.E., Laurenti, M.D., (2007). Comparison of parasitological, immunological and molecular methods for the diagnosis of leishmaniasis in dogs with different clinical signs. *Vet. Parasitol.* 145, 245–252.
- [59] Miro´, G., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Oliva, G., Baneth, G., (2008). Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 24, 371–377.
- [60] Bourdoiseau G, Bonnefont C , Chabanne L , Gevrey J , (1997) Modifications sanguines (cellulaires et humorales) chez le chien leishmanien . Suivi de chien infectés et traités. *Rev .Mes .Vet .* 148 (3) 219-228.
- [61] Cabassu J. P., Gervais P., SegureT N., Rousset-Rouviere B . (1988) Bilan biologique chez le chien leishmanien. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* .23-35-42.

- [62] **Duquenoy J. P (1994).** Contribution a l'étude epidemioclinique et immunopathogenique de la leishmaniose canine par le dosage du selenium et de la glutathion-peroxydase. These Doct. Vet, Lyon. No 54,
- [63] **Palacio J., Liste F., Gascon M (1997)** Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Vet. Record.* 140 (18) 477- 480
- [64] **Groulade P, BOURDEAU P., (1988)** Moyens pratiques de mise en evidence des leishmanies. *Prat. Med. Chir. Anim. Comp.* 23 73-79.
- [65] **Kar K (1995)** Serodiagnosis of leishmaniasis. *Crit. Rev. Microbiol.* 21 123-152.
- [66] **Mary C., (1994)** Immunodiagnostic de la leishmaniose : aspects actuels, *Med. Arm&es* 22 (1) 55-60.
- [67] **Reis, A.B., Teixeira-Carvalho, A., Vale, A.M., Marques, M.J., Giunchetti, R.C., Mayrink, W., Guerra, L.L., Andrade, R.A., Correa-Oliveira, R., Martins- Filho, O.A., (2006).** Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 102–116.
- [68] **Strauss-Ayali, D., Jaffe, C.L., Burshtain, O., Gonen, L., Baneth, G., (2004).** Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J. Infect. Dis.* 189, 1729–1733.
- [69] **Oliva, G., Scalone, A., Foglia Manzillo, V., Gramiccia, M., Pagano, A., Di Muccio, T., Gradoni, L., (2006).** Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.* 44, 1318–1322.
- [70] **Maia, C., Campino, L., (2008).** Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet. Parasitol.* 158, 274–287.
- [71] **Ferreira Ede, C., de Lana, M., Carneiro, M., Reis, A.B., Paes, D.V., da Silva, E.S., Schallig, H., Gontijo, C.M., (2007).** Comparison of serological assays for the diagnosis of canine visceral leishmaniasis in animals presenting different clinical manifestations. *Vet. Parasitol.* 146, 235–241.
- [72] **Porrozzì, R., Santos da Costa, M.V., Teva, A., Falqueto, A., Ferreira, A.L., dos Santos, C.D., Fernandes, A.P., Gazzinelli, R.T., Campos-Neto, A., Grimaldi Jr., G., (2007).** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 544–548.
- [73] **Boarino, A., Scalone, A., Gradoni, L., Ferroglio, E., Vitale, F., Zanatta, R., Giuffrida, M.G., Rosati, S (2005).** Development of recombinant chimeric antigen expressing

immunodominant B epitopes of *Leishmania infantum* for serodiagnosis of visceral leishmaniasis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 12, 647–653

[74] Angel S , O , Requena J , M , Criado D , Alonso C , (1996) During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83 kDa heat shock protein family elicits a strong humoral response , Acta Tropica . 62 (1) 45-56.

[75] Davoust B., Toga. I, Dunan S., Quilici M.. (1994) Leishmaniose dans les effectifs canins militaires, Med. Armees 22 (1) 33-38.

[76] Mettler, M., Grimm, F., Capelli, G., Camp, H., Deplazes, P., (2005). Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays, an immunofluorescent antibody test, and two rapid tests (immunochromatographic-dipstick and gel tests) for serological diagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania* infections in dogs. J. Clin. Microbiol. 43, 5515–5519.

[77] Ferroglio, E., Vitale, F., (2006). Diagnosis of leishmaniosis: between old doubts and new uncertainties. Vet. Res. Commun. 30, 35–38.

[78] Fisa R., Gallego M., Riera C., Aisa M. J., Valls D., Serra T., (1997) Colmenares M., Castillejo S., Portus M. De Colmenares M., Serologic diagnosis of canine leishmaniasis by dot ELISA, J. Vet. Diag. Invest. 9 (1) 50-55.

[79] Mancianti F., Falcone M. L., Giannelli C., Poli A. Comparison between an enzyme-linked immunosorbent assay using a detergent soluble *Leishmania infantum* antigen and indirect immunofluorescence for the diagnosis of canine leishmaniosis. Vet. Parasitol. 59 (1) (1995) 13-21.

[80] Vercammen F., Berkvens D., Ray D., Jacquet D., Vervoort T, Le Ray D., (1997) Development of a slide ELISA for canine leishmaniasis and comparison with four serological tests. Vet. Record. 141 (13) 328-330.

[81] Day, M.J., (2007). Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. Vet. Parasitol. 147, 2–8.

[82] Dieng T., (1985) .Etude comparee de l'electrosynerese et de l'immunofluorescence dans la leishmaniose canine. (Rapport de stage, DEA de parasitologie), Montpellier.

[83] Charrol P., (1989) .Contribution a l'etude du diagnostic immunologique de la leishmaniose canine. These Doct. Vet., Toulouse, 3 4937,

[84] Ashford D. A., Badaro R., Eulalio C , Freire M., Miranda C. Zalis M. G., David J. R., (1993) Studies of the control of visceral leishmaniasis : validation of the Falcon assay screening test enzyme linked immunosorbent assay (Fast Elisam) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis, Am. J. Trop. Med. Hyg. 48 (1) 1-8.

[85] Dos-Santos, W.L., Jesus, E.E., Paranhos-Silva, M., Pereira, A.M., Santos, J.C., Baleeiro, C.O., Nascimento, E.G., Moreira, E.D., Oliveira, G.G., Pontesde- Carvalho, L.C., (2008). Associations among immunological, parasitological and clinical parameters in canine visceral

leishmaniasis: emaciation, spleen parasitism, specific antibodies and leishmanin skin test reaction. Vet. Immunol. Immunopathol. 123, 251–259.

[86] **Miranda, S., Martorell, S., Costa, M., Ferrer, L., Ramis, A., (2007).** Characterization of circulating lymphocyte subpopulations in canine leishmaniasis throughout treatment with antimonials and allopurinol. Vet. Parasitol. 144, 251–260

[87] **Dunan S., Toga I., (1988)** Immunologie et leishmaniose, Prat. Med.Chir. Anim. Comp. 55 81-87.

[88] **Dereure J., Lanotte G., Pratlong F., Gouvernet J., Majhour J., Belazzoug S., Khiami A., Rageh H. A., Jarry D., Perieres J., Rioux J. A., (1998)** Leishmaniose canine a *Leishmania infantum* : intérêt et réalisation du test au latex. Applications en eco-epidemiologic. Bull. Sot. Pathol. Exot. 91 300-305.

[89] **Dereure J., (1993)** .Place du chien dans les complexes pathogenes leishmaniens des pays du pourtour mediterranee et du Moyen- Orient (Algerie, Egypte, France. Maroc, Syrie, Yemen), These Doct. Med., Montpellier.

[90] **Lamand R (1996)** .Etude de la séro-conversion par les techniques d'immunofluorescence indirecte. de Dot-blot et de Western-blot de chiens infecté naturellement et experimentalement par *Leishmania infantum* (Nicolle. 1908), These Doct. Vet, no 100. Lyon,

[91] **Soto M., Requena J. M., QUIJADA L. and ALONSO C. (1998)** - Multicomponent chimeric antigen for serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis, J. Clin. Microbial. 36 (1) 58-63.

[92] **Louis F. J., Garnotel E., Morillon M., (1998)** Diagnostic serologique rapide de la leishmaniose viscerale a *Leishmania donovani*, Med. Trop. 58 -25.

[93] **Crobu L., (1993)** .La leishmaniose canine : interet du diagnostic immunologique. Memoire d'initiation a la recherche, Montpellier, 1992.

[94] **Groulade P., BOURDEAU P., (1988)** Moyens pratiques de mise en evidence des leishmanies. Prat. Med. Chir. Anim. Comp. 23 73-79.

[95] **Loudiere C (1996)** Diagnostic experimental des parasitoses du chien et du chat, Thèse Doct. Vet. Toulouse. 3 4086.

[96] **Lamothe J., Ribot X., (1996)** Leishmaniose canine : du diagnostic au traitement, Bull. Mensuel de la Societe Veterinaire Pratique de France, 80 (5) 197-222.

[97] **Cabral M., Mc Nerney R., Gomes S., O'Grady J., Frame I., Sousa J. C., Miles M. A., Alexander J (1993),** Demonstration of natural *Leishmania* infection in asymptomatic dogs in the absence of specific humoral immunity, Proceedings of the Euroleish IV workshops epidemiology, health strategies and tools in leishmaniasis held at Tunis, Tunisia, 15-20 may 1993. Arch. Inst. Pasteur Tunis. 70 (3-4) 473-479.

- [98] **Antoniotti J. M (1993)** Contribution a l'étude d'un antigène circulant leishmanien chez le chien en zone d'endémie, Thèse Doct. Vet., Alfort, 1993, no 46.
- [99] **Gomes, Y.M., Paiva Cavalcanti, M., Lira, R.A., Abath, F.G., Alves, L.C., (2008).** Diagnosis of canine visceral leishmaniasis: biotechnological advances. *Vet. J.* 175, 45–52.
- [100] **Maia, C., Ramada, J., Cristovao, J.M., Goncalves, L., Campino, L., (2009).** Diagnosis of canine leishmaniasis: conventional and molecular techniques using different tissues. *Vet. J.* 179, 142–144.
- [101] **Manna, L., Reale, S., Vitale, F., Picillo, E., Pavone, L.M., Gravino, A.E., (2008).** Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J.* 177, 279–282.
- [102] **Reis, A.B., Martins-Filho, O.A., Teixeira-Carvalho, A., Giunchetti, R.C., Carneiro, C.M., Mayrink, W., Tafuri, W.L., Correa-Oliveira, R., (2009).** Systemic and compartmentalized immune response in canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128, 87–95
- [103] **Solano-Gallego, L., Rodriguez-Cortes, A., Trotta, M., Zampieron, C., Razia, L., Furlanello, T., Caldin, M., Roura, X., Alberola, J., (2007).** Detection of *Leishmania infantum* DNA by fret-based real-time PCR in urine from dogs with natural clinical leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 147, 315–319.
- [104] **Ferreira Sde, A., Ituassu, L.T., Melo, M.N., Andrade, A.S., (2008).** Evaluation of the conjunctival swab for canine visceral leishmaniasis diagnosis by PCR-hybridization in Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 152, 257–263
- [105] **Francino, O., Altet, L., Sanchez-Robert, E., Rodriguez, A., Solano-Gallego, L., Alberola, J., Ferrer, L., Sanchez, A., Roura, X., (2006) .** Advantages of realtime PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 137, 214–221.
- [106] **Bassenne I., Pratlong F., Dereure J., Balard Y., Dedet J.-P., (1997)** La leishmaniose humaine en Cevennes : etude retrospective 1933- 1994, *Med. Mal. Infect.* 27 591-595.
- [107] **Pratlong F., Martini A., Lambert M., Lefebvre M., Dedet J. P., Rioux J. A., (1994)** Interet de la culture et de l'identification isoenzymatique des leishmanies dans le diagnostic et l'epidemiologie des leishmanioses. *Med. Armees* 22 (1) 61-65.
- [108] **Saridomichelakis, M.N., Mylonakis, M.E., Leontides, L.S., Koutinas, A.F., Billinis, C., Kontos, V.I., (2005).** Evaluation of lymph node and bone marrow cytology in the diagnosis of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in symptomatic and asymptomatic dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 82–86.
- [109] **Tafuri, W.L. et al. (2004)** An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania* amastigotes in paraffin-embedded canine tissues. *J. Immunol. Methods* 292, 17–23.

- [110] **Chargui, N. et al. (2007)** Increase of canine leishmaniasis in a previously low-endemicity area in Tunisia. *Parasite* 14, 247–251
- [111] **Lachaud, L. et al. (2002)** Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection of canine visceral leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.* 40, 210–215
- [112] **Nasereddin, A. et al. (2006)** Serological survey with PCR validation for canine visceral leishmaniasis in northern Palestine. *J. Parasitol.* 92, 178–183
- [113] **Manna, L. et al. (2008)** Real-time PCR assay in *Leishmania*-infected dogs treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet. J* 177, 279–282
- [114] **Scalone, A. et al. (2002)** Evaluation of the *Leishmania* recombinant K39 antigen as a diagnostic marker for canine leishmaniasis and validation of a standardized enzyme-linked immunosorbent assay. *Vet. Parasitol.* 104, 275–285
- [115] **Porrozzì, R. et al. (2007)** Comparative evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays based on crude and recombinant leishmanial antigens for serodiagnosis of symptomatic and asymptomatic *Leishmania infantum* visceral infections in dogs. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 544–548
- [116] **Noli, C. and Auxilia, S.T. (2005)** Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* 16, 213–232
- [117] **Koutinas, A.F. et al. (2001)** A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* 98, 247–261
- [118] **Ikeda-Garcia, F.A. et al. (2007)** Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 143, 254–259
- [119] **Bianciardi, P. et al. (2004)** The efficacy of enrofloxacin, alone or combined with metronidazole, in the therapy of canine leishmaniasis. *Parasitol. Res.* 93, 486–492
- [120] **Pennisi, M.G. et al. (2005)** Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Vet. Rec.* 156, 346–349
- [121] **Croft, S.L. et al. (2006)** Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 111–126
- [122] **Borja-Cabrera, G.P. et al. (2002)** Long lasting protection against canine kala-azar using FML-QuilA saponin vaccine in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 20, 3277–3284
- [123] **Lemesre, J.L. et al. (2005)** Protection against experimental visceral leishmaniasis infection in dogs immunized with purified excreted secreted antigens of *Leishmania infantum* promastigotes. *Vaccine* 23, 2825–2840
- [124] **Mayrink, W. et al. (1996)** Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infection in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 695–697

- [125] **Giunchetti, R.C. et al. (2007)** A killed *Leishmania* vaccine with sand fly saliva extract and saponin adjuvant displays immunogenicity in dogs. *Vaccine* 26, 623–638
- [126] **Mohebali, M. et al. (2004)** Double-blind randomized efficacy field trial of alum precipitated autoclaved *Leishmania* major vaccine mixed with BCG against canine visceral leishmaniasis in Meshkin-Shahr district, I.R. Iran. *Vaccine* 22, 4097–4100.
- [127] **da Silva, V.O. et al. (2001)** A phase III trial of efficacy of the FML vaccine against canine kala-azar in an endemic area of Brazil (Sao Goncalo do Amaranto, RN). *Vaccine* 19, 1082–1092.
- [128] **Nogueira, F.S. et al. (2005)** Leishmune1 vaccine blocks the transmission of canine visceral leishmaniasis. Absence of *Leishmania* parasite in blood, skin and lymph nodes of vaccinated exposed dogs. *Vaccine* 23, 4805–4810.
- [129] **Santos, F.N. et al. (2007)** Immunotherapy against experimental canine visceral leishmaniasis with the saponin enriched-Leishmune vaccine. *Vaccine* 25, 6176–6190.
- [130] **de Oliveira Mendes, C. et al. (2003)** IgG1/IgG2 antibody dichotomy in sera of vaccinated or naturally infected dogs with visceral leishmaniosis. *Vaccine* 21, 2589–2597
- [131] **Lemesre, J.L. et al. (2007)** Long-lasting protection against canine visceral leishmaniasis using the LiESAp-MDP vaccine in endemic areas of France: double-blind randomized efficacy field trial. *Vaccine* 25, 4223–4234
- [132] **Gradoni, L. et al. (2005)** Failure of a multi-subunit recombinant leishmania vaccine (MML) to protect dogs from *Leishmania infantum* infection and to prevent disease progression in infected animals. *Vaccine* 23, 5245–5251
- [133] **Ramiro, M.J. et al. (2003)** Protection in dogs against visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is achieved by immunization with a heterologous prime-boost regime using DNA and vaccinia recombinant vectors expressing LACK. *Vaccine* 21, 2474–2484
- [134] **Rafati, S. et al. (2005)** Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinase type I and II of *L. infantum*. *Vaccine* 23, 3716–3725
- [135] **Rodríguez-Cortés, A. et al. (2007)** Vaccination with plasmid DNA encoding KMPII, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. *Vaccine* 25, 7962–7971
- [136] **Killick-Kendrick, R. et al. (1997)** Protection of dogs from bites of phlebotomine sandflies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.* 11, 105–111
- [137] **Otranto, D. et al. (2007)** Efficacy of a combination of 10% imidacloprid/ 50% permethrin for the prevention of leishmaniasis in kennel dogs in an endemic area. *Vet. Parasitol.* 144, 270–278

- [138] **Maroli, M. et al. (2001)** Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Med. Vet. Entomol.* 15, 358–363
- [139] **Foglia Manzillo, V. et al. (2006)** Deltamethrin-impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence on the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled stray dogs. *Vet. Parasitol.* 142, 142–145
- [140] **Gavvani, A.S. et al. (2002)** Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 360, 374–379
- [141] **Molina, R. et al. (2001)** Evaluation of a topical solution containing 65% permethrin against the sandfly (*Phlebotomus perniciosus*) in dogs. *Vet. Ther.* 2, 261–267
- [142] **Molina, R. et al. (2006)** Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs against *Phlebotomus perniciosus*. *Vet. Rec.* 159, 206–209
- [143] **Miro', G. et al. (2007)** Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet. Parasitol.* 143, 375–379
- [144] **Saridomichelakis, M.N. et al. (2005)** Periodic administration of allopurinol is not effective for the prevention of canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*) in endemic areas. *Vet. Parasitol.* 130, 199–205
- [145] **Guarga, J.L. et al. (2002)** Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88, 13–20
- [146] **Alexander, B. and Maroli, M. (2003)** Control of phlebotomine sandflies. *Med. Vet. Entomol.* 17, 1–18
- [147] **LAMOTHE J, GAUDRAY C, ZARKA P. (2004)** Diagnostic de la leishmaniose canine. *Prat. Méd. Chir. Anim. Cie*, 39, 41-46.
- [148] **KECK N. (2004)** Diagnostic de laboratoire de la leishmaniose canine. *Leishmaniose canine : Surveillance, diagnostic, traitement, prophylaxie. Résumés.* Lyon : Société Française de Parasitologie.