

Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques de la leishmaniose viscérale de l'adulte à l'hôpital de la Rabta à Tunis (Tunisie) entre 1983 et 2002.

A. Toumi (1), B. Kilani (1), L. Ammari (1), H. Tiouiri (1), F. Kanoun (1), S. Belhadj (1), E. Chaker (2) & T. Ben Chaabene (1)

(1) Service des maladies infectieuses, Hôpital La Rabta, 1007 Jebbari, Tunis, Tunisie. Tél. : 00 216 71 57 88 25, fax : 00 216 71 57 49 18, e-mail : badreddine.kilani@rns.tn
(2) Laboratoire de parasitologie-mycologie, Hôpital La Rabta, 1007 Jebbari, Tunis, Tunisie.

Manuscrit n° 2923. "Santé publique". Reçu le 21 février 2006. Accepté le 9 mai 2006.

Summary: Demographic, clinical and therapeutic features of adult visceral leishmaniasis at the Rabta hospital in Tunis (Tunisia) from 1983 to 2002.

The purpose of this study was to evaluate in a retrospective analysis, cases of Mediterranean visceral leishmaniasis (VL) diagnosed in adults during a 20-year period in a department of infectious diseases.

Demographic data, clinical and laboratory features and therapeutic findings were considered.

During the study period, 22 cases of VL were diagnosed, and 6 (27%) were associated with HIV infection. Fever and splenomegaly were observed in all cases. Anaemia was constant. The anti-leishmanial IF titer was positive among 21 patients (95%). Smears from bone marrow aspiration were positive at microscopy in 95% of cases. Zymodeme analysis was carried out in nine isolates. L. infantum zymodeme MON-1 was characterized in all cases. Seventeen patients (77%) received meglumine antimoniate (MA) (20 mg SbV/kg per day) and 5 (23%) patients amphotericin B (AB) (0,5-1 mg/kg per day) for an average period of 25 days (10-49 days). Adverse events occurred in 7 patients (32%), among them 4 received AB. Clinical cure was achieved with success in 21 patients (95%). After a successful MA treatment of the initial episode, VL relapse was observed in one HIV-positive patient. Only one HIV-positive patient died from neurological disorders.

VL is rare in adults. However, its incidence is increasing everywhere in the world, because of HIV-related cases. Its prognosis depends on the precocity of diagnosis and treatment.

Résumé:

Les données épidémiologiques, cliniques, biologiques, thérapeutiques et évolutives sont recueillies à partir des dossiers des malades hospitalisés dans le service des maladies infectieuses de l'hôpital La Rabta de 1983 à 2002.

Vingt-deux malades sont inclus dont 6 (27 %) infectés par le VIH. La fièvre et la splénomégalie sont retrouvées chez tous les malades. Les anomalies hématologiques sont dominées par l'anémie qui est constante. La sérologie de la leishmaniose est positive chez 21 malades (95 %). Le myélogramme a permis de retrouver les leishmanies dans 95 % des cas. Praticé chez 9 malades, le typage isoenzymatique a identifié la souche *Leishmania infantum*, zymodème MON-1 dans tous les cas. 17 malades (77 %) sont traités par les dérivés stibiés (20 mg SbV/kg/jour) et 5 (23 %) par l'amphotéricine B (0,5-1 mg/kg/jour) pendant une durée moyenne de 25 jours (10-49 jours). Une toxicité médicamenteuse est notée chez 7 malades (32 %) dont 4 ont reçu de l'amphotéricine B. L'évolution immédiate est favorable dans 21 cas (95 %). Une rechute est survenue chez un malade infecté par le VIH initialement traité par les dérivés stibiés. Un seul décès est survenu chez une malade infectée par le VIH.

visceral leishmaniasis
adult
AIDS
amphotericin B
hospital
Tunis
Tunisia
Maghreb
Northern Africa

leishmaniose viscérale
adulte
sida
amphotéricine B
hôpital
Tunis
Tunisie
Maghreb
Afrique du Nord

Introduction

La leishmaniose viscérale (LV) est une affection sévère due à un protozoaire intracellulaire du genre *Leishmania*. Il s'agit d'une zoonose qui touche les 5 continents et qui sévit dans 88 pays dont 72 pays en voie de développement. L'incidence annuelle dans le monde est estimée par l'OMS à 500 000 cas par an (24, 39). La LV sévit selon un mode endémique dans le bassin méditerranéen où elle pose un problème de santé publique. En effet, près de 1 000 personnes sont annuel-

lement touchées (40). Elle est connue depuis 1904 en Tunisie, où elle touche essentiellement l'enfant. Cependant, le nombre de cas d'adultes atteints de LV est de plus en plus élevé (5). La LV touche habituellement le sujet immunocompétent, mais peut survenir comme complication de certains états d'immunosuppression, notamment chez les personnes infectées par le VIH où son incidence est en hausse (35).

Nous rapportons dans ce travail notre expérience sur une période de 20 ans.

Patients et méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective menée dans le service des maladies infectieuses de l'hôpital La Rabta de Tunis de 1983 à 2002 à partir des dossiers des malades hospitalisés. Les patients éligibles sont des hommes et des femmes âgés de plus de 18 ans.

Les critères d'inclusion sont :

- la présence d'une fièvre (température > 37,8 °C) et/ou d'une hépato-splénomégalie;
- la présence d'une anémie (hémoglobine < 12 gr/dL), d'une thrombopénie (plaquettes < 150 000/mm³) et/ou d'une leucopénie (leucocytes < 4 000/mm³);
- la mise en évidence des leishmanies au niveau de la moelle osseuse à l'examen direct et/ou à la myéloculture et/ou après isolement du parasite sur sang périphérique après cytocentrifugation.

Tous les patients ont bénéficié d'une sérologie de la leishmaniose, d'un hémogramme, d'une étude de la fonction rénale et hépatique.

La LV est considérée comme associée à l'infection par le VIH quand les malades sont séropositifs pour le VIH au moment du premier épisode de LV. Les stades de l'infection par le VIH sont définis selon les critères de la classification du CDC d'Atlanta de 1993.

Deux molécules ont été utilisées pour le traitement. Il s'agit de l'antimoniote de meglumine (AM) à la dose de 20 mg SbV/kg/j, et de l'amphotéricine B (AB) à la dose de 0,5 à 1 mg/kg/j.

Les critères de guérison après traitement sont la disparition des signes cliniques et la correction des anomalies biologiques. Chez les malades infectés par le VIH, un myélogramme de contrôle est pratiqué pour confirmer la disparition du parasite.

La rechute est définie par la survenue d'un nouvel épisode de LV au décours d'un premier épisode traité avec succès.

Résultats

Durant la période d'étude, 22 cas de LV ont été diagnostiqués. Il s'agit de 14 hommes (64 %) et 8 femmes (36 %), dont l'âge moyen est de 29 ans (16-40 ans). Parmi eux, 14 malades (64 %) sont d'origine rurale ou sub-rurale. Parmi les 22 malades, 7 sont immunodéprimés. Il s'agit dans 6 cas (27 %) d'une infection par le VIH, et dans un cas d'un malade ayant un diabète de type II, compliqué d'une insuffisance rénale chronique au stade d'hémodialyse. Pour les patients infectés par le VIH, 3 sont toxicomanes par voie intraveineuse et 3 patients sont contaminés par voie sexuelle (hétérosexualité : 2 cas et homosexualité : 1 cas). 4 patients sont au stade B et 2 au stade C de la classification du CDC; le nombre de CD4 est inférieur à 200/mm³ dans tous les cas.

Au plan clinique, le délai moyen séparant le début des symptômes et le diagnostic de LV est de 13 semaines (1-40 semaines). Les signes cliniques sont dominés par la fièvre et la splénomégalie qui sont retrouvées chez tous les malades. Des signes fonctionnels faits d'asthénie, d'anorexie et d'amaigrissement sont présents dans 21 cas (95 %). Une hépatomégalie associée est plus rarement retrouvée (59 % des cas).

Au plan biologique, les anomalies hématologiques retrouvées à l'hémogramme sont dominées par l'anémie qui est constante. La leucopénie est notée chez presque tous les malades (95 %), alors que la thrombopénie n'est retrouvée que chez 11 malades (50 %). Une pancytopenie est notée chez 11 malades (50 %). Chez les patients infectés par le VIH, l'anémie et la leucopénie sont constantes. L'hypergamma-globulinémie

(gammaglobulines > 25 g/L) manque chez un malade infecté par le VIH.

Concernant le diagnostic parasitologique, la sérologie de la leishmaniose par immunofluorescence indirecte (IFI) est positive chez 21 malades (95 %). Le taux moyen est de 1/3 600, avec des extrêmes allant de 1/320 à 1/32 000. Chez un malade infecté par le VIH, l'IFI est négative alors que la technique de Western Blot est positive.

Le myélogramme pratiqué chez 21 malades a permis de retrouver les leishmanies à l'examen direct chez 20 d'entre eux (95 %). Chez le malade dont l'examen direct est négatif, la myéloculture a permis d'isoler le parasite.

Réalisée chez 9 malades, la culture du sang périphérique sur milieu NNN est positive dans 8 cas (88 %). La souche *Leishmania infantum*, zymodème MON-1 a pu être identifiée chez les 9 malades où cet examen a pu être réalisé.

Au plan thérapeutique, 17 malades (77 %) ont reçu un traitement à base d'AM tandis que 5 malades (23 %) sont traités par l'AB. La durée moyenne du traitement est de 25 jours (10-49 jours). Parmi ces patients, 16 (72 %) ont bénéficié de deux cures.

Des effets indésirables sont notés chez 7 malades (32 %), dont 4 recevaient de l'AB. Ils n'ont motivé la modification du traitement que chez 2 malades ayant respectivement présenté une insuffisance rénale (traitement par AB) et une cytolyse hépatique (traitement par AM). Par contre, le traitement par AB a été arrêté chez un malade qui a présenté une fièvre, des frissons et des vomissements itératifs malgré un traitement symptomatique.

L'évolution immédiate est favorable, avec une guérison clinique chez 21 malades (95 %). Un décès est survenu à la fin de la première cure chez une patiente infectée par le VIH dans un tableau de souffrance neurologique.

L'évolution ultérieure est marquée par la survenue d'une rechute clinique et parasitologique chez un malade infecté par le VIH deux mois et demi après la fin du traitement par AM. Il a été traité par AB pendant 28 jours, avec une évolution clinique et parasitologique favorable. Le recul moyen est de 8 mois et demi.

Discussion

En Tunisie, la LV sévit principalement sous son mode méditerranéen infantile dont le premier cas a été décrit en 1904 par LAVERAN et CATHOIRE à la Goulette (5).

La LV intéresse principalement le nord et le centre tunisien, avec une extension progressive vers le sud au cours de ces dernières années. En effet, la construction de barrages, la diffusion de l'eau potable et l'aménagement de lacs collinaires est responsable d'une redistribution des ressources hydriques, favorable à la prolifération des phlébotomes vecteurs des leishmanioses et à l'installation du chien, réservoir du parasite (7). Dans notre étude, tous les malades proviennent du nord tunisien et 64 % d'entre eux de zones rurales endémiques.

En Tunisie, l'incidence annuelle de la LV a augmenté passant de 30 cas par an, au début des années 90, à environ 100 à 150 cas par an, constitués majoritairement d'enfants (9). La proportion de cas d'adultes atteints de LV est supérieure à 10 % depuis 2000, alors qu'elle ne dépassait pas 3 à 5 % jusqu'au milieu des années 90 (5). Cette augmentation de la répartition en fonction de l'âge a été notée dans les pays nord méditerranéens dès la fin des années 1970. En effet, les cas d'adultes représentent 50 % des cas recensés de LV en Europe du sud, notamment en Espagne, en France et en Italie (23, 42, 46).

Dans notre étude, les cas de LV sont apparus régulièrement dans le temps.

L'atteinte de plus en plus fréquente de l'adulte peut s'expliquer par plusieurs facteurs. D'une part, il existe une diminution du contact homme-parasite due à l'urbanisation, faisant que les populations sont moins immunisées et plus susceptibles de développer la maladie. D'autre part, on note une multiplication de causes d'immunodépression, qu'elles soient secondaires à des traitements immunosuppresseurs ou à des infections virales dont principalement l'infection par le VIH. C'est ainsi que, depuis l'écllosion de l'épidémie du sida, plus de 1 900 cas de coinfection par le VIH et *Leishmania* ont été rapportés par l'OMS (15). On estime, par ailleurs, qu'entre 1,5 et 9 % des personnes infectées par le VIH développeront une LV dans le sud de l'Europe (14, 40). La LV est actuellement considérée comme une infection opportuniste à part entière, survenant principalement chez les adultes jeunes, volontiers toxicomanes par voie intraveineuse, suggérant la transmission du parasite par voie sanguine dans cette population (2, 34). Elle apparaît souvent à un stade avancé d'immunodépression puisque 42 à 77 % des malades sont au stade sida au moment de la survenue du premier épisode de LV, et que le taux de lymphocytes CD4 est inférieur à 200/mm³ chez 77 à 90 % d'entre eux (14, 30, 42). Dans notre étude, tous les malades infectés par le VIH étaient au stade sida.

Contrairement à l'enfant, le tableau clinique de la LV chez l'adulte peut être incomplet, retardant ainsi le diagnostic et le traitement (3, 5, 12). Ainsi la fièvre et la splénomégalie manquent dans 10 à 15 % des cas (41). Chez les sujets infectés par le VIH, la présentation clinique peut être atypique, avec l'atteinte inhabituelle de certains sites (poumon, tractus gastro-intestinal, péritoine) (10, 11, 33). En outre, l'absence plus fréquente de la splénomégalie pourrait s'expliquer par l'altération de la prolifération des macrophages (42). Dans notre étude, la présentation clinique de la LV est très proche de la forme typique. En effet, la fièvre et la splénomégalie sont retrouvées chez tous les malades.

Les données biologiques sont très contributives au diagnostic de la LV chez l'adulte immunocompétent. En effet, les troubles hématologiques à type d'anémie, de leucopénie et de thrombopénie, voire une pancytopénie, prennent toute leur valeur en dehors d'une immunodépression (12), ce qui n'est pas le cas chez les sujets infectés par le VIH (10, 19).

Dans notre étude, l'anémie était constante et la leucopénie notée dans 95 % des cas, rejoignant les données de la littérature. Une hypergammaglobulinémie polyclonale est souvent retrouvée au cours de la LV, portant principalement sur les Ig G (24). Cependant, son apport diagnostique reste limité au cours de l'infection par le VIH (24, 42).

Le diagnostic de la LV est double : sérologique et/ou parasitologique. Parmi les techniques sérologiques utilisées, c'est l'immunofluorescence indirecte (IFI) qui reste la plus courante. Sa sensibilité est voisine de 90 %. Toutefois, son intérêt reste limité en cas d'infection par le VIH car elle est alors négative une fois sur deux (25, 31, 46). D'autres techniques, telles que l'ELISA ou l'immunoblot, pourraient avoir une place chez ces malades (22, 32). Dans notre étude, 95 % des malades avaient une sérologie par IFI positive. Le malade, dont la sérologie était négative, est infecté par le VIH; la technique de Western blot s'est alors révélée positive. La recherche d'anticorps dans les urines par ELISA ou par test d'agglutination directe pourrait avoir un intérêt en pratique courante (26).

Le diagnostic de certitude reste parasitologique et repose sur la mise en évidence des leishmanies au niveau de la moelle

osseuse et/ou du sang périphérique. La sensibilité du prélèvement de moelle varie, selon les auteurs, de 80 à 100 %. Sa négativité ne doit donc pas éliminer le diagnostic (41, 42). La sensibilité des hémocultures est également bonne puisqu'elle atteint 90 % (16, 27). La détection de l'ADN parasitaire par PCR est une technique très sensible et d'intérêt particulier dans le suivi des sujets traités et comme marqueur précoce de rechute en cas de coinfection LV-VIH (38, 43). Cette technique vient d'être introduite dans notre laboratoire.

Le typage des souches de *L. infantum* isolées chez les malades tunisiens atteints de LV montre que le zymodème MON-1 est de loin le zymodème le plus fréquent, comme c'est le cas dans les autres pays du pourtour méditerranéen, aussi bien chez les sujets immunocompétents que chez ceux infectés par le VIH. Plus rarement, des zymodèmes MON-24 et MON-80 ont été isolés, notamment dans la région de Zaghouan (4, 44).

Le traitement de la LV repose sur les dérivés de l'antimoine, qui restent les médicaments de référence dans de nombreux pays (8, 45). La posologie d'antimoine recommandée par l'OMS est de 20 mg SbV/kg/jour. Nous l'avons utilisée chez la plupart de nos patients pendant 3 à 4 semaines, avec peu d'effets indésirables, même si ceux-ci peuvent survenir dans 10 à 15 % des cas (24, 30, 41). Des échecs de traitement ont été récemment rapportés, et laissent supposer l'existence d'une résistance des leishmanies vis-à-vis de l'antimoine (6, 48, 51). Le traitement par l'AB constitue une alternative aux dérivés stibiés. Elle inhibe la synthèse des stérols constituant la membrane des leishmanies (20). Utilisée à la dose de 0,5 à 1 mg/kg/jour, l'AB s'est montrée efficace. Elle présente cependant de nombreux effets adverses (8, 36). L'utilisation de l'AB, associée à des complexes lipidiques, a permis d'augmenter les doses thérapeutiques, de réduire la durée du traitement et les effets indésirables, et d'obtenir par conséquent une meilleure efficacité (30, 41, 49). Toutefois, son prix élevé limite son utilisation dans les pays en voie de développement, comme dans notre pays. Plus récemment, de nouvelles molécules efficaces par voie orale, la sitamaquine et surtout la miltéfosine, ont été utilisées avec succès dans le traitement de la LV (17, 28, 36, 50). En cas de rechutes ou de récurrences, d'autres molécules peuvent être associées aux dérivés stibiés ou à l'amphotéricine B, comme le métronidazole, le kétoconazole, le fluconazole ou l'allopurinol (21, 36, 53, 54).

Chez le sujet infecté par le VIH, le traitement de la LV est plus difficile et les échecs plus fréquents (20 à 70 % des cas) avec une mortalité avoisinant 20 % (14, 29, 30, 42). Un de nos patients infectés par le VIH a rechuté et nécessité une cure d'AB. L'AB liposomale a donné de bons résultats chez ces patients. L'interféron gamma, ayant un rôle immunostimulant, a été associé aux dérivés stibiés pour le traitement des rechutes chez les patients infectés par le VIH (52). La durée du traitement par l'AM ou par l'AB doit être d'au moins 4 semaines chez les malades coinfectés par le VIH (1, 29). Une meilleure réponse au traitement pourrait être obtenue chez les patients dont l'immunité se trouve restaurée par le traitement antirétroviral (13, 18, 47).

Conclusion

En attendant la disponibilité d'un vaccin efficace, le meilleur moyen de lutte contre cette zoonose reste l'éradication des vecteurs et du réservoir des parasites (chiens), ainsi que le dépistage et le traitement précoce des malades (36, 37).

Références bibliographiques

- ALVAR J, CANAVATE C, GUTTIREZ-SOLAR B, JIMINEZ M, LAGUNA F *et al.* – *Leishmania* and immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev*, 1997, **10**, 298-319.
- ALVAR J & JIMINEZ MI – Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS*, 1994, **8**, 854.
- AOUN K, BEN ROMDHANE N, BOURATBINE A & LIMAM F – Adénopathie leishmanienne isolée due à *Leishmania infantum*. *Presse Méd*, 2003, **31**, 1890-1892.
- AOUN K, BOURATBINE A, HARRAT Z, BELKAIED M & BEL HADJ ALI S – Profil particulier des zymodèmes de *Leishmania infantum* causant la leishmaniose viscérale en Tunisie. *Bull Soc Pathol Exot*, 2001, **5**, 375-377. (<http://www.pathexo.fr/pages/Bull-somm/2001/2001n5.html>)
- AOUN K, KOOLI C, BOURATBINE A, BEN ROMDHANE N, KAAROUD H *et al.* – Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose viscérale de l'adulte en Tunisie. *Méd Mal Infect*, 2002, **32**, 387-392.
- BEN SAID M, MILI A, AMRI F & KHARRAT H – Resistance to N-methylglucamine in Tunisian visceral leishmaniasis children. *Acta Parasitol Turcica*, 1997, **21 Suppl 1**, 395.
- BEN SALAH AB, BEN ISMAIL R, AMRI F, CHLIF S, BEN RZIG F *et al.* – Investigation of the spread of human visceral leishmaniasis in central Tunisia. *Trans R Soc Med Hyg*, 2000, **94**, 382-386.
- BERMAN JD – Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin Infect Dis*, 1997, **24**, 684-703.
- BOURATBINE A, AOUN K, CHAHED MD & BEN ISMAÏL R – Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile en Tunisie en 1993 (lettre). *Méd Mal Infect*, 1998, **28**, 446-447.
- BOURGEADE A, NOSNY Y & BADIGA S – Aspects cliniques de la leishmaniose viscérale à l'ère du sida. *Méd Mal Infect*, 1994, **24**, 566-571.
- DATRY A, SIMILOWSKI T, JAIS P, ROSENHEIM M, KATLAMA C *et al.* – AIDS-associated leishmaniasis: an unusual gastroduodenal presentation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1990, **84**, 239-240.
- DAVIDSON RN – Visceral leishmaniasis in clinical practice. *J Infect*, 1999, **39**, 112-116.
- DE LA ROSA R, PINEDA JA, DELGADO J, MACIAS J, MORILLAS F *et al.* – Influence of highly active antiretroviral therapy on the outcome of subclinical visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*, 2001, **32**, 633-635.
- DE LA ROSA R, PINEDA JA, DELGADO J, MACIAS J, MORILLAS F *et al.* – Incidence of and risk factors for symptomatic visceral leishmaniasis among human immunodeficiency virus type 1-infected patients from Spain in the era of highly active antiretroviral therapy. *J Clin Microbiol*, 2002, **3**, 762-767.
- DEL GIUDICE P, MARY-KRAUSE M, PRADIER C, GRABAR S, DELLAMONICA P *et al.* – French Hospital Database on HIV Clinical Epidemiologic Group. Impact of highly active antiretroviral therapy on the incidence of visceral leishmaniasis in a french cohort of patients infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis*, 2002, **186**, 1366-1370.
- DEREURE J, PRATLONG F, REYNES J, BASSET P, BASTIEN P & DEDET JP – Haemoculture as a tool for diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-negative and HIV-positive patients: interest for parasite identification. *Bull Organ Mond Santé*, 1998, **76**, 203-206.
- DIETZE R, CARVALLO SF, VALLI LC, BERMAN J, BREMER T *et al.* – Phase 2 trial of WR6028, an orally administered 8-aminoquinoline, in the treatment of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania chagasi*. *Am J Trop Med Hyg*, 2001, **65**, 685-689.
- FERNANDEZ COTARELO MJ, ABELLAN MARTINEZ J, GUERRA VALES JM, MARTINEZ SANCHEZ P, RODRIGO GOMEZ DE LA BARCENA M & SALTO FERNANDEZ E – Effect of highly active antiretroviral therapy on the incidence and clinical manifestations of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-infected patients. *Clin Infect Dis*, 2003, **37**, 973-977.
- GAMBARELLI F, PIARROUX R, LAMOUREUX D, MARY C, DUMAN S & DUMON H – La leishmaniose viscérale à l'ère du sida. Les difficultés du diagnostic biologique. *Méd Mal Infect*, 1994, **24**, 572-575.
- GANGNEUX JP – Traitement de la leishmaniose viscérale: modalités récentes. *Presse Méd*, 1999, **28**, 2057-2066.
- GANGNEUX JP, DULLIN M, SULAHIAN A, GARIN YJP & DEROUIN F – Experimental evaluation of second line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1999, **1**, 172-174.
- GARY-TOUSSAINT M, LE LIEVRE A, MARTY P & LE FICHOUX Y – Contribution of serological tests to the diagnosis of visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**, 301-302.
- GASCIO A, GRADONI L, SCARLATA F, GRAMICCIA M, GIOGDANO S *et al.* – Epidemiologic surveillance of visceral leishmaniasis in Sicily, Italy. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 75-78.
- GUERAIN PJ, OLLIARO P, SUNDAR S, BOELAERT M, CROFT SL *et al.* – Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, 2002, **2**, 494-501.
- IQBAL J, HIRA PR, SAROJ G, PHILIP R, AL-ALI F *et al.* – Imported visceral leishmaniasis: diagnosis dilemmas and comparative analysis of three assays. *J Clin Microbiol*, 2002, **2**, 475-479.
- ISLAM MZ, ITOH M, MIRZA R, AHMED I, EKRAM AR *et al.* – Direct agglutination test with urine samples for the diagnosis of visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 2004, **1**, 78-82.
- IZRI MA, DENIAU M, BRIERE C, RIVOLLET D, PETHITORY JC *et al.* – Leishmaniasis in AIDS patients: results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis. *Bull Organ Mond Santé*, 1996, **74**, 91-93.
- KUHLEUCORD A, MANIERA T, EIBL H & UNGER C – Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, **36**, 1630-1634.
- LAGUNA F, LOPEZ-VELEZ R, PULIDO F, SALAS A, TORRE-CISNEROS J *et al.* – Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. *AIDS*, 1999, **13**, 1063-1069.
- LAGUNA F, VIDELA S, JIMINEZ-MEJIAS ME, SIRERA G, TORRE-CISNEROS J *et al.* – Amphotericin B lipid complex versus antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J Antimicrob Chemother*, 2003, **52**, 464-468.
- MAALEJ IA, CHENIK M, LOUZIR H, BEN SALAH A, BAHLOUL C *et al.* – Comparative evaluation of ELISAs based on the recombinant or purified *Leishmania* antigens for the serodiagnosis of Mediterranean visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, 2003, **3**, 312-320.
- MARY C, LAMOUREUX D, DUMAN S & QUILICI M – Western Blot analysis of antibodies to *Leishmania infantum* antigens: potential role of the 14-KD and the 16-KD antigens for diagnosis and epidemiologic purposes. *Am J Trop Med Hyg*, 1992, **47**, 764-771.
- MATHERON S, CABIE F, PARQUIN F, MAYAUD C, ROUX P *et al.* – Visceral leishmaniasis and HIV infection: unusual presentation with pleuropulmonary involvement, and effect of secondary prophylaxis. *AIDS*, 1992, **6**, 238-240.
- MEDRANO FJ, HERNANDEZ-QUERO J, JIMINEZ E, PINEDA JA, RIVERO A *et al.* – Visceral leishmaniasis: a human opportunistic infection in Spain? *AIDS*, 1992, **6**, 1499-1503.
- MIRALLES GD, STOECKLE MY, MC DERMOTT DF, FINKELMAN FD & MURRAY WH – Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. *Infect Immun*, 1994, **62**, 1058-1063.
- MURRAY HW – Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, **8**, 2185-2197.
- MURRAY HW – Kala-azar. Progress against a neglected disease. *N Engl J Med*, 2002, **22**, 1793-1794.
- NUZUM E, WHITE F, THAKUR C, DIETZE R, WAGES J *et al.* – Diagnosis of symptomatic visceral leishmaniasis by the use of the PCR in patient blood. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 751-754.
- ORG MOND SANTÉ – *Leishmania* and HIV in gridlock. WHO/CTD/LEISH/98.9 add. 1, UNAIDS/98.23, Genève, Suisse.
- ORG MOND SANTÉ – *Leishmania*/HIV co-infection. Epidemiological analysis of 692 retrospective cases. *Rel Épidemiol Hebd*, 1997, **72**, 49-54.
- PAGLIANO P, ROSSI M, RESCIGNO C, ALTIERI S, COPPOLA MG *et al.* – Mediterranean visceral leishmaniasis in HIV-negative adults: a retrospective analysis of 64 consecutive cases (1995-

- 2001). *J Antimicrob Chemother*, 2003, **52**, 264-268.
42. PINTADO V, MARTIN-RABADAN P, RIVERA ML, MORENO S & BOUZA E – Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV-infected patients. *Medicine*, 2001, **80**, 54-73.
 43. PIZZUTO M, PIAZZA M, SENESE D, SCALAMOOGNA C, CALATTINI S *et al.* – Role of PCR in diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol*, 2001, **1**, 357-361.
 44. PRATLONG F, DEDET JP, MARTY P, PORTUS M, DENIAN M *et al.* – *Leishmania* human immunodeficiency virus coinfection in the mediterranean basin : isoenzymatic characterisation of 100 isolates of the *Leishmania infantum* complex. *J Infect Dis*, 1995, **172**, 323-326.
 45. RAPP C, SIMON F & DORDAIN ML – L'antimoniate de N-methyl glucamine, ou glucantime. *Méd Trop*, 2000, **60**, 342-343.
 46. ROSENTHAL E, MARTY P, POIZOT-MARTIN I, REYNES J, PRATLONG F *et al.* – Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Southern France. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1995, **89**, 159-162.
 47. RUSSO R, NIGRO L, PANARELLO G & MONTINERI A – Clinical survey of Leishmaniasis/HIV co-infection in Catania, Italy. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART). *Ann Trop Med Parasitol*, 2003, **97 Suppl 1**, 149-155.
 48. SINGH N, SINGH RT & SUNDAR S – Novel mechanism of drug resistance in kala-azar field isolates. *J Infect Dis*, 2003, **188**, 600-607.
 49. SUNDAR S, AGRAWAL NK, SINHA PR, HORWITH GS & MURRAY HW – Short course, low-dose amphotericin B lipid complex therapy for visceral leishmaniasis unresponsive to antimony. *Ann Intern Med*, 1997, **127**, 133-137.
 50. SUNDAR S, JHA TK, THAKUR CP, ENGEL J, SINDERMANN H *et al.* - Oral miltefosine for indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med*, 2002, **22**, 1739-1746.
 51. SUNDAR S, MORE DK, SINGH MK, SINGH VP, SHAMARA S *et al.* – Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis*, 2000, **31**, 1104-1106.
 52. SUNDAR S, ROSENKAÏMER F, LESSER M & MURRAY HW – Immunochemotherapy for an intracellular infection accelerated response using IFN- in visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 1995, **171**, 992-996.
 53. SUNDAR S, SINGH VP, AGRAWAL NK, GIBBS DL & MURRAY HW - Treatment of kala-azar with oral fluconazole. *Lancet*, 1996, **348**, 614.
 54. WALI JP, AGGWARI P, CAPUTA U, SALUJA S & SINGH S - Ketoconazole in treatment of visceral leishmaniasis. *Lancet*, 1990, **336**, 810-811.