

LE KATEX POUR LE DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE VISCERALE HUMAINE

M. HOMMEL, B. SARKARI, J. CARNEY, M.L. CHANCE

Med. Trop. 2001 ; **61** : 503-505

RESUME • Un nouvel outil diagnostique pour la leishmaniose viscérale humaine est en cours d'analyse multicentrique au Soudan, en Inde, au Népal, au Brésil et en Espagne. Le Katex est un test au latex qui permet de détecter de façon très spécifique la présence d'antigènes leishmaniens dans l'urine des patients, y compris ceux co-infectés leishmaniose-VIH. Les auteurs décrivent la valeur du test en comparaison à d'autres tests diagnostiques de routine, en particulier la microscopie et la sérologie, et suggèrent son utilisation possible sur le terrain comme test de confirmation et comme outil de suivi thérapeutique.

MOTS-CLES • Leishmaniose viscérale - Antigène - Urine - Diagnostic biologique.

KATEX FOR DIAGNOSIS OF HUMAN VISCERAL LEISHMANIASIS

ABSTRACT • Kat ex is a latex agglutination test allowing highly specific detection Leishmania antigen in urine of patients with visceral leishmaniasis. A multicentric study of this new diagnostic tool which is also effective in patients co-infected by leishmaniasis and HIV is currently in progress in Sudan, India, Nepal, Brazil and Spain. The authors describe the utility of this technique in comparison with other routine diagnostic procedures such as microscopic examination and serological tests. Preliminary results suggest that it could be used to confirm infection in the field and to monitor treatment efficacy.

KEY WORDS • Visceral leishmaniasis - Antigen - Urine - Laboratory diagnosis.

En l'absence de signes cliniques pathognomoniques, le diagnostic de la leishmaniose viscérale repose entièrement sur l'utilisation de tests de laboratoire. Parmi ces tests, la mise en évidence d'amastigotes par microscopie reste la technique de référence, bien qu'il s'agisse d'une méthode invasive qui nécessite une biopsie de moelle osseuse ou une aspiration splénique. D'un autre côté, bien que les tests sérologiques (ELISA, immunofluorescence, DAT ou K39) fournissent une information très utile, surtout lorsqu'ils sont utilisés à bon escient et de concert avec une présomption clinique, la sérologie ne permet pas de faire la différence entre une leishmaniose viscérale, une infection asymptomatique ou une infection passée (1, 2). Chez les malades présentant une co-infection VIH-leishmaniose, le diagnostic est encore plus difficile car la symptomatologie clinique est particulièrement atypique, il est difficile d'effectuer des biopsies et la sérologie est fréquemment négative.

Il y a, tous les ans, plus de 12 millions de cas de leishmaniose viscérale dans le monde et la plupart d'entre eux surviennent dans les zones rurales de pays en développement (90% sur le continent indien), chez des malades pauvres et malnutris (3). Un diagnostic de leishmaniose aboutit à la mise en route d'un traitement long (3 semaines d'injections quo-

tidiennes), coûteux et relativement dangereux puisque les médicaments disponibles sont soit des antimoniés, soit l'amphotéricine B. Si, comme c'est encore fréquemment le cas, ce diagnostic est uniquement basé sur la symptomatologie clinique (une fièvre prolongée avec perte de poids et présence d'une splénomégalie), plus de 75% des patients seront traités à tort, vu l'inefficacité de cette présomption clinique. D'un point de vue de santé publique, un meilleur diagnostic permettra de sauver des vies, réduira le risque de développement de résistance au tout petit nombre de médicaments encore disponibles et permettra une économie de moyens (considérant le coût des médicaments, il est moins cher de payer pour un test diagnostique que d'utiliser un traitement présomptif de tous les cas) (4). Pour être utilisables, les méthodes diagnostiques devront l'être au niveau du dispensaire rural en pays en développement : il devra donc s'agir de tests robustes, peu coûteux, faciles à effectuer et à interpréter, ne nécessitant pas d'équipement.

Récemment, nous avons identifié des antigènes urinaires dont la présence semble être très spécifique de la leishmaniose viscérale. Cet article discute des possibilités et des limites de ce nouvel outil diagnostique.

DETECTION D'ANTIGENES DANS L'URINE

Dans les infections parasitaires chroniques comme la leishmaniose viscérale, la recherche d'antigènes dans le sang se heurte à un obstacle important : la présence d'anticorps et d'immuns complexes circulants. Théoriquement, la recherche d'antigènes dans l'urine souffre moins de ce problème,

• *Travail du Liverpool School of Tropical Medicine (M.H., Alfred Jones and Warrington Yorke Professor of Tropical Medicine; B.S., Research Student; M.L.C., Senior Lecturer in Medical Parasitology), Liverpool, UK, et de Kalon Biological Ltd (J.C.,), Ash Vale, Surrey GU 12 5QJ, UK.*

• *Correspondance* : M. HOMMEL, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembrokeplace, Liverpool L3 5QA, UK • *Fax*: +44 151 7088733 • *e-mail* : mhommel@liv.ac.uk •

• *Article sollicité.*

puisque les immuns complexes ne traversent la barrière rénale qu'à un stade tardif de la maladie lorsque celle-ci s'accompagne de protéinurie ou d'amyloïdose. A cet intérêt théorique, s'ajoutent les avantages logistiques d'un test ne nécessitant pas de prise de sang. Tout ceci explique pourquoi la mise au point de tels tests a fait l'objet d'études dans la bilharziose (5), la maladie de Chagas (6), le paludisme (7), la filariose lymphatique (8), le kyste hydatique (9) et la leishmaniose viscérale (10-12). Jusqu'ici, ces études n'ont eu que des résultats médiocres et ce n'est guère que dans la bilharziose que les tests de détection d'antigènes urinaires (en particulier, l'antigène cathodique circulant ou CCA) ont été appliqués avec succès dans des études de terrain (13).

ANTIGENES URINAIRES THERMOSTABLES

Le KAtex (contraction de Kala Azar-latex) utilise un anticorps polyclonal anti-leishmanie, fixé aux particules de latex, pour la détection d'antigènes urinaires dans la leishmaniose viscérale. Les résultats préliminaires de ce test sont encourageants (montrant une sensibilité d'au moins 80 % et une excellente spécificité) et le test possède toutes les caractéristiques logistiques nécessaires pour pouvoir être utilisé dans de bonnes conditions au niveau du dispensaire rural (Fig. 1).

L'une des caractéristiques du KAtex est la nécessité de bouillir l'urine avant le test pour éviter les réactions non spécifiques. L'existence de tels faux positifs dans près de 20 % des urines de contrôle, est observée avec tous les tests au latex quelque soit l'anticorps utilisé, ce qui explique peut-être pourquoi cette technique simple et peu coûteuse n'est pas utilisée plus souvent. Dans le cas de la leishmaniose viscérale, nous avons la chance d'obtenir un test au latex hautement spécifique par le simple fait de bouillir l'urine avant le test ; en outre, ceci nous apprend que nous avons affaire à un antigène thermostable et de nature non protéique. Comme la molécule impliquée ne se colore ni au bleu de Coomassie ni à l'argent dans les gels de polyacrylamide (SDS-PAGE), et n'adhère ni au nitrocellulose ni au polystyrène, sa caractérisation par les méthodes immunochimiques s'est avérée être particulièrement difficile. La molécule a finalement été reconnue être un carbohydrate d'environ 5-15 kDa de poids moléculaire et des arguments indirects, y compris le marquage de la molécule et l'utilisation d'une série d'anticorps monoclonaux, indique qu'il s'agit d'un produit de dégradation provenant des protéophosphoglycanes présents à la surface des leishmanies (LPG, aPPG et pPPG) (14).

ANALYSE MULTICENTRIQUE DU KATEX

Pour confirmer les résultats obtenus au cours des essais préliminaires, nous avons mis en route une analyse multicentrique dans plusieurs pays où la leishmaniose viscérale est endémique, le Soudan, le Népal, l'Inde, le Brésil et l'Espagne (Fig. 1). Outre la confirmation des performances du test (sensibilité et spécificité), cet essai pose les questions suivantes :

• le test est-il suffisamment fiable pour remplacer la microscopie ? Cette question est fondamentale car il est difficile d'accepter qu'au XXI^e siècle il continue à être néces-



Figure 1 - KAtex utilisé par un médecin au Népal (collection M. Hommel).

saire, pour faire un diagnostic, d'avoir à enfoncer une aiguille dans la rate du patient, avec tous les risques que cela comporte (et une mortalité de près de 1 % dans les meilleures mains). Ceci d'autant plus que la microscopie est loin d'être le test de référence idéal (sensibilité relativement faible, difficulté de lecture, nécessité d'un microscope en bon état de fonctionnement et de microscopistes compétents). Ce n'est que dans l'analyse comparative des principaux tests disponibles, du formol gel-test à la PCR, effectués dans les meilleures conditions possibles, qu'une réponse à une telle question pourra émerger.

• le test peut-il permettre d'évaluer l'efficacité du traitement ? Cette question est importante, car la résistance aux antimonies est de plus en plus fréquente et il est crucial de pouvoir déterminer si l'infection est contrôlée à la fin du traitement et il n'existe en ce moment aucune méthode satisfaisante pour évaluer l'efficacité thérapeutique, puisque la sensibilité de la microscopie n'est pas suffisante et les tests sérologiques restent positifs longtemps après le traitement. Les résultats préliminaires obtenus dans le suivi d'infections expérimentales chez le rat cotonnier suggèrent que le KAtex se négat ive avant la fin du traitement (15) et les résultats obtenus récemment en Inde chez un petit nombre de patients

suiuis après traitement sont encourageants (T.M. Mohapatra et Coll., résultats non publiés).

• le test peut-il être utilisé pour dépister des cas au stade préclinique de l'infection ? Il s'agit probablement là de la question la plus difficile : il est certain que, dans une étude de population, la sérologie est capable de dépister les infections asymptomatiques, mais dans le petit nombre d'études où les patients ont été suivis longitudinalement (par exemple, la cohorte de Jacobina au Brésil) (16), seule une fraction des asymptomatiques a éventuellement développé une leishmaniose viscérale. La vraie question est donc de savoir si une détection d'antigènes permettra de distinguer une infection asymptomatique d'une infection au stade préclinique (ce que la sérologie est incapable de faire). D'une certaine façon, un problème analogue se pose pour les patients avec co-infection VIH-leishmaniose, chez lesquels il semble qu'une infection asymptomatique vraie puisse redevenir active du fait de l'immunosuppression, ce qui explique que les patients présentant une infection VIH en zone d'endémie de leishmaniose soient 100 fois plus susceptibles de présenter une leishmaniose viscérale que les individus non-infectés par le VIH (17). Nous avons montré récemment, dans une étude de 11 cas provenant de Madrid, que le KAtex était corrélé non seulement parfaitement avec les résultats de la microscopie, mais encore que les taux d'antigènes détectés chez ces patients étaient parmi les plus forts que nous ayons observés jusqu'ici.

• le test est-il vraiment spécifique de la leishmaniose ? Jusqu'ici, toutes les études effectuées avec le KAtex ont montré une spécificité de presque 100 % par comparaison aux résultats de la microscopie et à condition que l'urine ait préalablement été bouillie pendant 5 minutes. Bien qu'il soit difficile de prédire le degré de cette spécificité, les tests *in vitro* d'extrait parasitaires ont montré que l'antigène cible de 5-15 kDa était présent chez toutes les leishmanies testées, mais absent chez les autres espèces de *Kinetoplastidae*; il est donc peu probable que le test soit positif chez les patients avec une trypanosomose. L'analyse multicentrique permettra de confirmer que le test reconnaît bien toutes les sous-espèces de leishmanies, sans pour cela croiser avec *Trypanosoma cruzi*. On ne s'attend pas à ce que le test soit positif chez les patients présentant une leishmaniose cutanée ou cutanéomuqueuse, car la charge parasitaire est en général faible; les cas de leishmaniose cutanée diffuse (DCL) ou de *post-kala azar dermal leishmanoid* (PKDL) sont trop rares pour être inclus dans une analyse multicentrique.

PERSPECTIVES D'AVENIR

Au cours du développement du KAtex, nous avons également mis au point un ELISA, utilisant soit les mêmes anticorps polyclonaux (lapin ou mouton) utilisés dans le KAtex, soit une combinaison d'anticorps monoclonaux et d'anticorps polyclonaux : ces nouveaux formats du test permettent d'avoir à disposition des méthodes quantitatives qui peuvent avoir une utilité dans le suivi des patients traités. Dans le cas de l'ELISA monoclonal/polyclonal, il est possible d'utiliser le test pour la détection d'antigènes dans le sang ou le sérum. Sur la base de ces résultats, nous sommes convaincus qu'il sera possible de mettre au point un test sur

bandelettes pour la détection d'antigènes leishmaniens (comparable aux tests récemment développés pour le paludisme, la bilharziose ou la filariose lymphatique). Il est évident que si ces nouveaux formats pourront avoir une application dans le diagnostic de la leishmaniose dans les pays industrialisés, le KAtex (dont la sensibilité n'est pas inférieure à celle de l'ELISA correspondant) restera l'outil de choix pour une utilisation sur le terrain ■

REFERENCES

- 1 - ZIJLSTRA E.E., MODABBER F. - The Leishmaniasis/Diagnosis. In « GILLES H.M. - Protozoal diseases ». Arnold ed., London, 1999, pp 426-439.
- 2 - HOMMEL M. - Visceral leishmaniasis : biology of the parasite. *J. Infect.* 1999; **39** : 101-111.
- 3 - ASHFORD R.W., DESJEUX P., DE RAADT P. - Estimation of population at risk and number of cases of leishmaniasis. *Parasitol. Today* 1992; **8** : 104-105.
- 4 - BOELAERT M., LYNEN L., DESJEUX P., VAN DER STUYFT P. - Cost-effectiveness of competing diagnostic-therapeutic strategies for visceral leishmaniasis. *Bull. World Health Organ.* 1999; **77** : 667-674.
- 5 - CORRAL R.S., ORN A., FREILIJ H.L., BERGMAN T., GRINSTEIN S. - Purification and characterization of an 80 KD *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1989; **27** : 145-151.
- 6 - VAN ETTEN L., FOLMAN C.C., EGGELTE T.A. et Coll. - Rapid diagnosis of schistosomiasis by antigen detection in urine with a reagent strip. *J. Clin. Microbiol.* 1994; **32** : 2404-2406.
- 7 - KATZIN A.M., KIMURA E.S., ALEXANDRE C.O., RAMOS A.M. - Detection of antigen in urine of patients with acute *falciparum* and *vivax* malaria infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1991; **45** : 453-462.
- 8 - LUTSCH C., CESBRON J.Y., HENRY D. et Coll. - Lymphatic filariasis : detection of circulating and urinary antigen and differences in antibody isotypes complexed with circulating antigen between symptomatic and asymptomatic subjects. *Clin. Exp. Immunol.* 1988; **71** : 253-260.
- 9 - PARIJA S.C., RAVINDER P.T., RAO K.S. - Detection of hydatid antigen in urine by counter-current immunoelectrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 1997; **35** : 1571-1574.
- 10 - KOHANTEB J., ARDEHALI S.M., REZAI H.R. - Detection of *Leishmania donovani* antigen and antibody in the urine of visceral leishmaniasis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1987; **81** : 578-580.
- 11 - DE COLMENARES M., PORTUS M., RIERA C. et Coll. - Short report : detection of 72-75-KD and 123-KD fractions of *Leishmania antigen* in urine of patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; **52** : 427-428.
- 12 - AZAZY A.A., CHANCE M.L., DEVANEY E. - A time-course study of circulating antigen and parasite-specific antibody in cotton rats infected with *Leishmania donovani*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 1997; **91** : 153-162.
- 13 - POLMAN K., STELMA F.F., GRYSEELS B. et Coll. - Epidemiologic application of circulating antigen detection in a recent *Schistosoma mansoni* focus in northern Senegal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; **53** : 152-157.
- 14 - SARKARI B., CHANCE M., HOMMEL M. - Antigenuria in visceral leishmaniasis : detection and characterisation of a low molecular weight carbohydrate antigen. *Acta Tropica* 2001 (sous presse).
- 15 - ATTAR Z.J., CHANCE M.L., EL-SAFI S. et Coll. - Latex agglutination test for the detection of urinary antigens in visceral leishmaniasis. *Acta Tropica* 2001; **8** : 11-16.
- 16 - BADARO R., JONES T.C., CARVALHO E.M. et Coll. - A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J. Infect. Dis.* 1986; **154** : 639-649.
- 17 - ROSENTHAL E., MARTY P., POIZOT-MARTIN I et Coll. - Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1995; **89** : 159-162.