

---

# EFFICACITE DES COLLIERS SCALIBOR<sup>®</sup> IMPREGNES DE DELTAMETHRINE DANS LA PREVENTION DE LA LEISHMANIOSE CANINE DANS LA REGION DE TUNIS

K. AOUN <sup>1,2\*</sup>, E. CHOUHI <sup>1</sup>, I. BOUFADEN <sup>3</sup>, R. MAHMOUD <sup>3</sup>,  
A. BOURATBINE <sup>1,2</sup> ET K. BEDOUI <sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Laboratoire de Recherche LR 05-SP 03 «Parasitoses émergentes».

<sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie Clinique, Institut Pasteur de Tunis, 13 Place Pasteur - BP 74, 1002 Tunis.

<sup>3</sup> Service Vétérinaire et d'Hygiène Alimentaire, Ministère de l'Intérieur, Tunisie.

\* Auteur correspondant: Tél: 00216 98 699 512; Fax: 00216 71 791 833; E-mail: Karim.Aoun@fmt.rmu.tn.

---

## RESUME

Les colliers imprégnés d'insecticides, par leur action anti-phlébotome, sont actuellement cités comme le principal moyen de prévention de la leishmaniose canine. Une évaluation du collier Scalibor<sup>®</sup> imprégné de deltaméthrine a été entreprise dans des sites actifs de leishmaniose de la région de Tunis. Quatre vingt chiens indemnes de leishmaniose, 42 avec collier et 38 sans, ont eu un suivi sérologique avant et après les saisons estivales de transmission de 2005 et 2006. Les séroconversions ont été dépistées par la technique ELISA et contrôlées par celle d'immunofluorescence indirecte. La confirmation de l'infection des chiens ayant séroconvertis s'est basée sur la mise en évidence du parasite en culture sur milieu NNN ou de son ADN après amplification par la technique PCR en temps réel.

Six parmi les 38 chiens non porteurs de colliers, soit une proportion de 15,8%, ont été infectés par *Leishmania infantum* au cours de l'étude contre aucun des chiens porteurs; la différence est statistiquement significative, ( $p=0,02$ ). Ce résultat est une confirmation supplémentaire des propriétés prophylactiques contre la leishmaniose canine des colliers Scalibor<sup>®</sup>.

---

## SUMMARY

The anti-sandflies and, insecticides impregnated collars are actually mentioned as the main mean for prevention and control of Canine leishmaniasis. An evaluation of the Scalibor<sup>®</sup> collar was undertaken in leishmaniasis active sites in Tunis area, (northern Tunisia). Eighty leishmaniasis free dogs (42 collared and 38 as control dogs) were submitted to a serological detection using ELISA technique for anti-*Leishmania* antibodies before and after transmission season in 2005 and 2006.

Seroconversions were detected by ELISA and controlled by indirect immunofluorescence antibodies test. Confirmation of infection in seroconverted dogs was based on the detection of the parasite by culture in NNN medium or detection of parasite's DNA by real time PCR.

Among 38 control dogs, 6 (15,8%) were infected by *Leishmania infantum* during the study period against zero in the collar group; the difference is statistically significant ( $p=0,02$ ). This result is an additional confirmation of the prophylactic properties of Scalibor<sup>®</sup> protector band against canine leishmaniosis.

**Mots clés:** Leishmaniose canine, sérologie, démographie, surveillance, *L. infantum*, contrôle.

**Key words:** Canine leishmaniasis, serology, demography, follow-up, *L. infantum*, control.

## INTRODUCTION

*Leishmania (L.) infantum* est endémique autour du bassin méditerranéen, en Asie centrale et en Amérique du Sud où il est responsable chez l'homme de maladies viscérales et cutanées <sup>1</sup>. Son réservoir majeur est représenté par le chien et sa transmission fait suite à des piqûres de phlébotomes infectés <sup>2,3</sup>. En Tunisie, les leishmanioses à *L. infantum* représentent des problèmes importants de santé humaine et animale <sup>2,4</sup>. La prévalence de la leishmaniose canine varie dans le nord et le centre du pays de 5 à 30% <sup>5,6</sup>. Les chiens de races importées, les plus utilisés pour la compagnie, la garde ou l'investigation semblent les plus touchés par la maladie <sup>7</sup>. La prise en charge de la leishmaniose canine, en Tunisie ou ailleurs, reste à ce jour confrontée à des difficultés aussi bien thérapeutiques que prophylactiques. Dans l'attente de vaccins ou de traitements accessibles et efficaces, les colliers imprégnés d'insecticides, par la réduction des piqûres de phlébotomes, sont considérés comme l'alternative la plus intéressante pour prévenir cette maladie <sup>8,9</sup>. Ce travail prospectif est la 1<sup>ère</sup> contribution à l'évaluation des colliers imprégnés de deltaméthrine dans un pays sud-méditerranéen, caractérisé par des taux d'incidences des leishmanioses canine et humaine supérieurs à ceux nord-méditerranéen où ont eu lieu la majorité des études antérieures <sup>3,5,9,10,11,12,13</sup>.

## MATERIEL ET METHODES

### Lieu de l'étude

les chiens étudiés ont été recrutés dans des chenils de 3 banlieues proches de Tunis: le Bardo, l'Aouina et Rades. Ces localités étant des sites stables et actifs de transmission de *L. infantum* <sup>3,7</sup>.

### Durée de l'étude

le suivi des chiens s'est étalé de février 2005 à décembre 2006.

### Population des chiens étudiés et port des colliers

Cent quarante trois chiens policiers âgés de 2 à 11 ans ont été enrôlés au départ. Ils appartiennent à 3 races, Bergers allemands, Rottweiller et Malinois, et étaient tous asymptomatiques. Une sérologie de la leishmaniose par la technique ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) leur a été systématiquement pratiquée. Les colliers testés, de la marque Scalibor® (Intervet, Pays-bas) contenant 760mg de deltaméth-

rine, ont été attribués par tirage au sort à 50% des chiens séronégatifs; l'appariement s'est fait selon l'âge, la race et le sexe dans chacun des 3 sites de l'étude. Ils ont été placés au début du mois d'Avril et retirés à la fin du mois d'Octobre des années 2005 et 2006. Pendant toute la période du port des colliers, le toilettage des chiens s'est limité à l'eau de robinet pour éviter d'éventuels effets inhibiteurs de certains détergents.

## Explorations biologiques

### • Les prélèvements

Des prélèvements de sang veineux sur tubes citratés qui entrent dans le cadre du suivi vétérinaire régulier des chiens policiers ont été pratiqués en février 2005, décembre 2005 et décembre 2006. Après centrifugation à 2500 rpm pendant 10min, le plasma a été recueilli pour la sérologie et la couche leucocytaire (CL) a été congelée pour une éventuelle extraction de l'ADN en vue d'une PCR (polymerase chain reaction); la PCR n'a été pratiquée que pour les chiens ayant présenté une séroconversion leishmanienne au cours de l'étude. De même, chaque fois qu'un chien s'est révélé séropositif, un 2<sup>ème</sup> prélèvement a été réalisé en vue de cultures.

### • La sérologie

La recherche d'anticorps spécifiques anti-*Leishmania* a été effectuée par une technique ELISA locale utilisant des antigènes solubles d'un isolat canin de *L. infantum* zymodème MON-1. La technique ELISA étant connue pour son excellente sensibilité, presque toujours supérieure à 95% dans les différentes études <sup>12,14,15,16</sup>, et son adaptation aux enquêtes épidémiologiques. La technique d'immunofluorescence indirecte (IFI) a été pratiquée pour les plasmas positifs en ELISA; un Kit commercial (*Leishmania*-spot IF, Biomérieux-France) a été utilisé; les sérums ont été dilués de 1/2 en 1/2 à partir de la dilution 1/50 et ont été considérés positifs en présence d'une fluorescence au moins à la dilution au 1/100. Ainsi, un cas de séroconversion est défini par une positivité en ELISA et en IFI.

### • Les cultures

Les CL des chiens séropositifs ont été ensemencées sur milieu NNN (Novy, Nicolle, Mac Neal) <sup>17</sup>. Les cultures ont été incubées à 26°C et repiquées tous les 7 jours pendant un mois. Les isolats positifs ont été typés au laboratoire de Parasitologie de la faculté

de Pharmacie de Monastir par électrophorèses sur gel épais d'amidon de 15 systèmes enzymatiques selon la technique de Rioux et al.<sup>18</sup>.

### • La PCR (*polymerase chain reaction*)

Une PCR en temps réel a été pratiquée sur certains prélèvements ciblés. L'extraction de l'ADN s'est faite par le Kit Qiaamp DNA Mini Kit Blood (QIAGEN, Germany) et l'amplification sur un appareil TaqMan selon la technique décrite par Mary et al.<sup>19</sup>.

### • Analyse des données

le test  $\chi^2$  exact de Fisher a été utilisé pour comparer les pourcentages.

## RESULTATS

### Les chiens retenus pour l'étude

Cent vingt-six des 143 chiens de départ ont été retenus pour l'étude. Le critère d'exclusion des 17 autres a été une ELISA positive (13 chiens, soit une séroprévalence de 9,1%) ou une ELISA à la limite du seuil de positivité (4 chiens). Des 126 chiens de départ, seules les données de 81 d'entre eux, 42 avec colliers (23 à l'Aouina, 11 à Rades et 8 au Bardo) et 39 sans (16 à l'Aouina, 14 à Rades et 9 au Bardo), ont servi pour l'analyse finale des résultats. En effet, 45 chiens supplémentaires ont aussi été éliminés: 43 ayant manqué le 2<sup>ème</sup> et/ou le 3<sup>ème</sup> prélèvement, un ayant déchiré son collier et un ayant présenté une allergie de contact à type d'érythème autour du cou qui a nécessité le détachement de son collier.

### Les séroconversions

Sept chiens ont présenté une séroconversion vis à vis de la leishmaniose au cours de l'étude. Ils avaient, en effet, leurs prélèvements initiaux (février 2005) négatifs en ELISA alors que l'un au moins de leurs

2 prélèvements ultérieurs était positif en ELISA et en IFI (Tableau I). Aucun n'avait de collier. Parmi les 7 séroconversions, 4 ont été observées après la 1<sup>ère</sup> saison de transmission (décembre 2005) et 3 après la 2<sup>ème</sup> saison de transmission (décembre 2006). Il est à signaler que seuls 3 des 7 chiens concernés présentaient à la découverte de leur séropositivité des signes cliniques de leishmaniose du type amaigrissement, hypertrophie ganglionnaire, hypergriffosité et ulcères cutanés.

### La confirmation de l'infestation au cours de l'étude des chiens séroconvertis

Elle s'est basée sur des techniques parasitologiques de mise en évidence du parasite *Leishmania*, en culture ou par PCR, et a intéressé les 7 chiens ayant présenté une séroconversion. La 1<sup>ère</sup> étape a été de vérifier la négativité initiale par la technique PCR sur les CL de février 2005. Six des 7 chiens s'étaient révélés indemnes de leishmaniose, le 7<sup>ème</sup> par contre présentait déjà de l'ADN leishmanien et était donc déjà infecté avant l'étude (Tableau I); il a été par conséquent éliminé de l'analyse finale. La confirmation de l'infection leishmanienne après séroconversion s'est en 1<sup>er</sup> lieu basée sur les cultures des CL sanguines dont 4 sur 7 s'étaient révélées positives y compris celle du chien avec PCR positive en février 2005 (Tableau I). Pour les 3 CL négatives en culture, la PCR a été pratiquée et s'est révélée positive dans les 3 cas montrant des parasitemies de  $2.26, 17,3 \cdot 10^3$  et  $15 \cdot 10^4$  parasites par ml de sang (Tableau I).

Nous retenons donc après confrontation des données sérologiques aux critères parasitologiques, que 6 de nos chiens sans collier ont été infectés pendant l'étude soit un taux d'infection réel en 2 ans chez ces chiens de 15,8% statistiquement supérieur à celui de 0% des chiens avec colliers,  $p=0.02$ .

**Tableau I : Résultats de la sérologie, de la PCR et des cultures des 7 chiens séroconvertis pendant l'étude.**

CN	Février 2005		Décembre 2005			Décembre 2006		
	AC	PCR	AC	NNN	PCR	AC	NNN	PCR
1	-	-	+	-	+	NF	NF	NF
2	-	-	+	+	NF	NF	NF	NF
3	-	-	+	-	+	NF	NF	NF
4	-	-	-	NF	NF	+	+	NF
5	-	-	-	NF	NF	+	+	NF
6	-	-	-	NF	NF	+	-	+
7	-	+	+	+	NF	NF	NF	NF

AC: Anticorps anti-leishmanies par les techniques ELISA et IFI; PCR: PCR en temps réel; NNN: culture sur milieu NNN; +: test positif; -: test négatif; NF: test non fait. Le CN n°7 n'a pas été retenu pour l'analyse finale des résultats.

## DISCUSSION

La non disponibilité de vaccins efficaces d'une part et les performances relatives des thérapeutiques proposées d'autre part font que les insecticides anti-phlébotomes émergent de nos jours comme les principales alternatives pour le contrôle et la prévention de la leishmaniose canine<sup>1, 8, 20</sup>. Les colliers, imprégnés de deltaméthrine, apparaissent comme la présentation de choix<sup>8, 21</sup>. Ils agissent sur les phlébotomes par des effets répulsifs, anti-repas sanguins et en induisant la mortalité des femelles gorgées<sup>8, 21, 22</sup>. Ils permettent ainsi de réduire la transmission du parasite et par conséquent de l'incidence de la maladie<sup>1, 8</sup>. La deltaméthrine incorporée dans les colliers Scalibor® est un produit très lipophile qui diffuse progressivement dans la phase lipidique de tout le revêtement cutané des chiens. Aux doses utilisées, inférieures à 5 ng/ml de sang, elle est bien tolérée par les chiens; Dans le travail présent, seul un chien a présenté une réaction allergique locale, à type d'érythème autour du cou, rapidement résolutive après détachement du collier. L'ensemble des essais évaluatifs probants de tels colliers dans la prévention contre la leishmaniose canine méditerranéenne ont été réalisés dans des pays endémiques nord-méditerranéens<sup>8, 13</sup>. Notre étude est la première dans les conditions épidémiologiques, socio-économiques et environnementales sud-méditerranéennes.

En Tunisie, l'activité des phlébotomes peut aller certaines années particulièrement douces de début avril à novembre<sup>23, 24</sup>, soit au-delà des 6 mois d'action des colliers Scalibor®. C'est pourquoi, afin de prévenir l'éventualité d'une saison de transmission qui se révélerait particulièrement longue, tous les colliers ont été renouvelés pendant notre étude à la mi saison de transmission soit vers le 15 juillet.

En vue de n'inclure dans l'étude que des chiens indemnes de toute infection leishmanienne, un dépistage sérologique par la technique ELISA, connue pour sa grande sensibilité<sup>12, 14, 25</sup>, a été systématiquement pratiqué pour les 143 chiens asymptomatiques recrutés. Il est, en effet, retenu que le portage asymptomatique de *L. infantum* est courant en zone d'endémie de la zoonose<sup>6, 12, 26, 27</sup>. Ce dépistage a permis d'ailleurs d'écarter 13 chiens et de n'en garder que 126. Le taux de séroprévalence global chez la population d'étude était de 9, ce qui rejoint les données de la littérature tunisienne et confirme la transmission de la leishmaniose dans les sites d'étude<sup>6, 28</sup>. Quarante cinq des 126 chiens initiale-

ment inclus ont été secondairement écartés principalement car l'un de leurs prélèvements ultérieurs a manqué, à cause de transferts loin de Tunis ou de décès accidentels ou suite à des pathologies autres que la leishmaniose. Cette exclusion de chiens est habituelle dans pareilles études<sup>13</sup>, la proportion des chiens éliminés dans notre étude (35,7%) est proche de celle rapportée par Foglia et al.<sup>13</sup> (50%) en Italie. Cependant, contrairement à cette dernière étude où des pertes de colliers ont été notées dans 35% des cas, seul un chien (2,4%) a détaché son collier dans notre série. La différence s'expliquerait par l'étroite et rigoureuse surveillance dont font l'objet les chiens policiers de notre série.

Afin d'éviter, au cours du suivi des chiens négatifs retenus, des réactions croisées responsables de faux positifs et donc de faux séro-convertis, toutes les ELISA positives ont été confirmées par la technique d'IFI réputée pour sa meilleure spécificité<sup>12, 29</sup>.

Sept séroconversions ont été observées au cours de l'étude (Tableau I). Toutes ont intéressé des chiens sans collier. Pour s'assurer qu'aucun des 7 chiens concernés n'ait été déjà infecté avant l'étude malgré son ELISA initiale négative, une PCR en temps réel (PCR), plus sensible<sup>16, 19, 30</sup>, a été pratiquée sur leurs CL de février 2005 conservées à -70°C. Ce test s'est révélé négatif chez 6 des 7 chiens séroconvertis confirmant que leur infection était récente postérieure au démarrage de l'étude. Pour le 7<sup>ème</sup> chien, par contre, de l'ADN de *L. infantum* a été mis en évidence prouvant l'infection antérieure à l'étude de ce chien (Tableau I). D'autre part, la présence de *L. infantum* dans les prélèvements correspondants au virage sérologique (le 2<sup>ème</sup> ou le 3<sup>ème</sup>), a été vérifiée par un critère parasitologique de haute spécificité, la mise en évidence de promastigotes en cultures sur milieu NNN ou d'ADN en PCR<sup>17, 29, 31</sup>, ce qui permet de retenir de façon indiscutable l'infection des 6 chiens séroconvertis. Trois cultures de CL sanguines s'étaient révélées positives démontrant une sensibilité des cultures comparable aux données de la littérature<sup>25, 32</sup>. La culture du 7<sup>ème</sup> chien antérieurement infecté était aussi positive. Le typage iso-enzymatique des 4 souches isolées a permis d'identifier le zymodème *L. infantum* MON-1, le seul jusque là retrouvé chez le chien en Tunisie<sup>3</sup>. Pour les 3 chiens aux cultures négatives, la PCR a confirmé l'infection en révélant des parasitemies sanguines de 2.26, 17.3 10<sup>3</sup> et 15 10<sup>4</sup> parasite/ml. Il résulte de l'ensemble des résultats que 6 des 38 chiens sans colliers (15,8%)

ont été infectés par *L. infantum* au cours de l'étude contre aucun de ceux porteurs de colliers. La différence entre les deux groupes est statistiquement significative ( $p=0.02$ ), confirmant dans la région de Tunis, les propriétés protectrices contre la leishmaniose des colliers Scalibor® comme déjà rapporté en Italie, en Iran, en France et au Brésil<sup>8, 13, 21, 22, 33</sup>. Il est, par ailleurs, à signaler qu'en plus de leur action prophylactique directe pour les chiens indemnes, l'application des colliers aux chiens atteints de leishmaniose, toujours porteurs du parasite et infectants pour les phlébotomes, permet de réduire les repas de sang infectants et ainsi la circulation du parasite protégeant indirectement les chiens indemnes voir les humains vivant à leur contact<sup>9, 20</sup>.

## REFERENCES

- 1- J. Alvar, C. Canavate, R. Molina, J. Moreno et J. Nieto (2004). Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.*, **57**, 1-88.
- 2- K. Aoun, A. Bouratbine, Z. Harrat, I. Guizani, M. Mokni, M. Belkaid, A. Ben Osman et R. Ben Ismail (2000). Données épidémiologiques concernant la leishmaniose cutanée sporadique du nord tunisien. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **93**, 101-103.
- 3- K. Aoun, MF. Diouani, R. Benikhlef, A. Bouratbine, S. Ben Haj Ali, Z. Harrat, M. Belkaid, M. Kilani et R. Ben Ismail (2003). *Leishmania infantum* MON-1: seul zymodème isolé chez les chiens leishmaniens en Tunisie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **96**, 77-79.
- 4- A. Bouratbine, K. Aoun, M.K. Chahed et R. Ben Ismail (1998). Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile. *Méd. Mal. Infect.*, **28**, 446-447.
- 5- M. Ben Said, A. Jaïem, M. Smorembourg, S.J. Semiao-Santos, M.S. Ben Rachid et A. El Harith (1992). La leishmaniose canine dans la région d'Enfidha. Estimation de la séro-prévalence par agglutination directe (DAT) et immunofluorescence indirecte (IFAT). *Bull. Soc. Path. Exot.*, **159**, 159-163.
- 6- M. Boelaert, K. Aoun, J. Liinev, E. Goetghebeur et P. Van Der Stuyft (1999). The potential of Latent Class Analysis in diagnostic test validation of canine *Leishmania infantum* infection. *Epidemiol. Infect.*, **123**, 499-506.
- 7- A. Bouratbine, K. Aoun, M. Gharbi, H. Haouas, J. Zeroui, Z. Harrat, Babba H. et M.A. Darghouth (2005). Données épidémiologiques, cliniques et parasitologiques sur la leishmaniose générale canine en Tunisie. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **98**, 359-362.
- 8- R. Killick-Kendrick, M. Killick-Kendrick, C. Focheux, J. Dereure, M.P. Puech et M.C. Cadiergues (1997). Protection of dogs from bites of phlebotomine sand flies by deltamethrin collars for control of canine leishmaniasis. *Med. Vet. Entomol.*, **11**, 105-111.
- 9- J. Lucientes (1999). Laboratory observation on the protection of dogs from bites of *Phlebotomus perniciosus* with scalibor protector bands: preliminary results. In: R. Killick-Kendrick (éd): Canine leishmaniasis: an update, Hoechst Roussel Vet, Wiesbaden, 92-4.
- 10- A. Bouratbine, K. Aoun, M.K. Chahed et R. Ben Ismail (1998). Données épidémiologiques sur la leishmaniose viscérale infantile en Tunisie en 1993 (lettre). *Méd. Mal. Infect.*, **28**, 446-447.
- 11- J.P. Dedet (2000). Les leishmanioses : actualités. *Press. Méd.*, **29**, 1019-1026.
- 12- R. Fisa, M. Gallego, S. Castillejo, M.J. Aisa, T. Serra, C. Riera, J. Carrio, J. Gallego et M. Portus (1999). Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain). The example of the Priorat focus. *Vet. Parasitol.*, **83**, 87-97.
- 13- V. Foglia-Manzillo, G. Oliva, A. Pagano, L. Manna, M. Maroli et L. Gradoni (2006). Deltamethrin impregnated collars for the control of canine leishmaniasis: evaluation of the protective effect and influence in the clinical outcome of *Leishmania* infection in kennelled dogs. *Vet. Parasitol.*, **142**, 142-145.
- 14- D. Ashford, R. Badaro, C. Eulalio, M. Freire, C. Miranda, M.G. Zalis et J.R. Darid (1993). Studies on the control of visceral leishmaniasis: Validation of the Falcon assay screening test-enzyme linked immunosorbent assay (Fast-ELISA) for field diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **48**, 1-8.
- 15- J.R. Ryan, A.M. Smithyman, G.H. Rajasekarian, L. Hocheberg, J.M. Stitler et S.K. Martin (2002). Enzyme linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 1037-1043.
- 16- G. Oliva, A. Scalone, V. Foglia-Manzillo, M. Gramiccia, A. Pagano et al. (2006). Incidence



- and time course of *Leishmania infantum* infectious examined by parasitological, serological, and nested-PCR techniques in a cohort of naïve dogs exposed to three consecutive transmission seasons. *J. Clin. Microbiol.*, **44**, 1318-1322.
- 17- C. Nicolle (1908). Culture du parasite du bouton d'orient. *Comptes Rendus Hebd. Séances Acad. Sciences Paris.*, **146**, 842-853.
  - 18- J.A. Rioux, G. Lanotte, E. Serres, F. Pratlong, P. Bastien et J. Périères (1990). Taxonomy of leishmania. Use of isoenzymes, Suggestion for a new classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **65**, 111-125.
  - 19- C. Mary, F. Faraut, M.P. Drogoul, B. Xeridat, N. Schleinitz, B. Cuisenier et H. Dumon (2006). Reference value for *Leishmania infantum* parasitemia in different clinical presentations : quantitative polymerase chain reaction for therapeutic monitoring and patients follow up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **75**, 858-863.
  - 20- R. Molina, G. Miro, R. Galvez, J. Nieto et M.A. Descalzo (2006). Evaluation of a spray of permethrin and pyriproxyfen for the protection of dogs from *Phlebotomus perniciosus*. *Vet. Res.*, **159**, 206-209.
  - 21- R. Reithinger, U. Teodoro et C.R. Davis (2001). Topical insecticide treatments to protect dogs from sand fly vectors of leishmaniasis. *Emerging Infectious Diseases*, **7**, 872-876.
  - 22- P. Halbig, M.H. Hodjati, A.S. Mazlouidi-Gavani, H. Mohite et C.R. Davies (2000). Further evidence that deltamethrin impregnated collars protect domestic dogs from sand flies bites. *Med. Vet. Entomol.*, **14**, 223-226.
  - 23- H. Croset, J.A. Rioux, M. Maistre et N. Bayar (1978). Les phlébotomes de Tunisie (Diptera, phlebotomidae). Mise au point systématique, chorologique et éthologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **46**, 711-749.
  - 24- J. Ghrab, A. Rhim, D. Bach Hamba, M.K. Chahed, K. Aoun, S. Nouira et A. Bouratbine (2006). Phlebotominae (Diptera: Psychodidae) of human Leishmaniosis sites in Tunisia. *Parasite*, **13**, 23-33.
  - 25- E. Rosenthal, P. Marty, I. Poizot-Martin, J. Reynes, F. Pratlong, A. Lafeuillade, D. Jaubert, O. Boulat, J. Dereure et F. Gambarelli (1995). Visceral leishmaniasis and HIV-1 co-infection in southern France. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **89**, 159-162.
  - 26- F. Berrahal, C. Mary, M. Roze, A. Berebger, K. Escoffier, D. Lamouroux et S. Dumon (1996). Canine leishmaniasis: identification of asymptomatic carriers by polymerase chain reaction and immunoblotting. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **55**, 273-277.
  - 27- L. Manna, S. Reale, E. Viola, F. Vitale, V.F. Manzillo, P.L. Michele, S. Caracappa et A.E. Gravino (2006). *Leishmania* DNA load and cytokine expression levels in asymptomatic naturally infected dogs. *Vet. Parasitol.*, **142**, 271-280.
  - 28- C. Nicolle et C. Comte (1908). Origine canine du Kala-Azar. *Arch. Inst. Pasteur Tunis.*, **3**, 99-103.
  - 29- P. Marty, Y. Le Fichoux, F. Pratlong et M. Gari-Toussaint (1994). Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **88**, 33-34.
  - 30- C. Mary, F. Faraut, L. Lascombe et H. Dumon (2004). Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J. Clin. Microbiol.*, **52**, 49-55.
  - 31- F. Vitale, S. Reale, M. Vitale, E. Petrotta, A. Torina et S. Caracappa (2004). TaqMan Based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1026**, 139-143.
  - 32- S. Belhaj, N.E. Toumi, H. Dakhli, K. Kallel, N. Boussen, T. Ben Chaabene et E. Chaker (2002). La culture du sang périphérique comme moyen diagnostique de la leishmaniose viscérale: à propos de 61 cas. *Med. Trop.*, **62**, 155-157.
  - 33- M. Maroli, V. Mizzoni, C. Siraguza, A. D'Orazi et L. Gradoni (2001). Evidence for an impact on the incidence of canine leishmaniasis by the mass use of deltamethrin-impregnated dog collars in southern Italy. *Medical and Vet. Entomology.*, **15**, 358-363.