



Royaume du Maroc
Université Sidi Mohamed Ben Abdallah Faculté
de médecine et de Pharmacie de Fès



Mémoire de fin de spécialité :

EVALUATION DU TEST DE DIAGNOSTIC RAPIDE RK39 DANS LA LEISHMANIOSE VISCERALE INFANTILE

SPECIALITE : PEDIATRIE

Réalisé par :

Docteur TASSOU FATIMA EZZAHRA

Née le 21/08/1986 à Fès

Sous la direction de :

Professeur MOUSTAPHA HIDA

Session Juin 2016

A notre maître, monsieur le professeur Hida Moustapha

Nous vous remercions la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail.

Quotidiennement, la mesure de vos critiques toujours constructives et argumentées nous permet de progresser dans le sens de la compréhension des connaissances partagées, avec tout le doute nécessaire à la pratique de la médecine en général et de la pédiatrie clinique en particulier.

Nous sommes tout particulièrement touchés par la patience et par la grande confiance accordées tout au long de notre cursus.

Vous vous y êtes grandement impliqués par vos directives, vos remarques et suggestions, mais aussi par vos encouragements dans les moments clés de son élaboration.

Veuillez trouver ici, Monsieur, l'expression de notre profonde reconnaissance. Soyez assuré de notre respect le plus sincère.

A notre maitre, monsieur le professeur Bouharrou Abdelhak

Nous avons eu la chance et le privilège de travailler sous votre direction, de profiter de votre culture scientifique, vos compétences professionnelles incontestables ainsi que vos qualités humaines qui vous valent l'admiration et le respect. Puissent des générations et des générations avoir la chance de profiter de votre savoir qui n'a d'égal que votre sagesse et votre bonté.

A nos maitres : Atmani Samir, Chaouki Sana,

Votre présence au service m'a été d'un grand apport et avec vous s'est enrichi mon amour pour la spécialité et s'est épanoui le sens de responsabilité et notre tendance à la perfection. J'ai pu bénéficier d'un enseignement théorique et pratique qui m'a permis de progresser dans cette discipline.

A nos maîtres : Idrissi Lakhdar Mounia, Abourazzak Sana, Souilmi Fatimazahra, Oulmaati Abdellah, Benmiloud Sarra, Hmami Fouzia

Vos compétences, votre dynamique, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnelles ont suscité en nous une grande admiration et un profond respect. Nous voudrions être digne de la confiance que vous nous avez accordée et vous prions, chers Maîtres, de trouver ici le témoignage de notre sincère reconnaissance et profonde gratitude.

PLAN

Introduction.....	6
Généralités	9
A-Epidémiologie de la leishmaniose viscérale infantile.	10
B-Biologie du parasite	12
C-Immunité anti-leishmanienne.....	15
D-Diagnostic clinique.....	17
E-Diagnostic Biologique.....	18
Matériels et méthodes	20
1-Type, période et lieu de l'étude	21
2-Critères d'inclusion.....	21
3-Méthodologie et collecte des cas	21
4-Différents examens de certitude utilisés chez nos patients	22
RESULTATS	26
A-Résultats descriptifs	32
B-Résultats analytiques	43
DISCUSSION	47
A-Présentation générale des tests rapides	48
B-Méthodes de diagnostic de la leishmaniose viscérale : Avantage et inconvénients.....	54
C-Test rapide rk 39 pour le diagnostic de leishmaniose viscérale	59
1-Méthodologie	59
2-Performances du test rapide rk 39	59
3-Limites du test rapide rk 39.....	63
CONCLUSION	64
RESUME	66
BIBLIOGRAPHIE.....	69

INTRODUCTION

La leishmaniose viscérale (LV) est une infection parasitaire commune à l'Homme et à certains animaux, engendrée par un protozoaire flagellé du genre **leishmania** ayant un tropisme électif pour le système phagocytaire mononuclé (macrophages, histiocytes, monocytes) et transmise par un insecte diptère qui est le **phlébotome**.

Selon l'OMS, l'incidence de la LV est estimée à 500 000 cas par an, sa mortalité est évaluée à 70 000 cas annuellement. C'est la forme la plus grave de la maladie, qui, si non traitée, atteint un taux de mortalité d'environ 100%. Afin d'éradiquer cette pathologie, un programme de lutte a été établi [1][3].

Au Maroc, la LV est largement prédominante dans les régions du Rif et du pré-Rif (Chefchaoun, Taounate, Taza, Fès, Moulay yacoub, Meknès, Séfrou, Al Hoceima et sidi kacem)[3].

Le diagnostic doit être suspecté chez tout patient ayant séjourné en zone endémique présentant un état fébrile persistant associé à une splénomégalie. La présence d'une pancytopénie, syndrome inflammatoire, ou hypergammaglobulinémie renforce la suspicion diagnostique. Le diagnostic de confirmation repose classiquement sur la visualisation des formes amastigotes (intramacrophagique) des parasites à l'examen microscopique du matériel obtenu après aspiration médullaire[1][22]. Des techniques de PCR permettent d'augmenter la sensibilité diagnostique sur ces prélèvements et sur le sang veineux[22]. La culture plus longue, facilite l'isolement et le typage de la souche. Plusieurs techniques sérologiques fondées sur des techniques d'agglutination, d'immunofluorescence, d'ELISA ou de Western blot ont également démontré une excellente sensibilité et spécificité [38]. Toutes ces méthodes nécessitent un laboratoire équipé, du matériel spécialisé et un personnel qualifié. En outre, l'emplacement des laboratoires spécialisés dans les grandes villes, ne leur permet pas de couvrir la totalité des provinces. Or un test rapide, simple, sensible et

spécifique s'avère indispensable pour le diagnostic et le dépistage de masse dans les régions lointaines et démunies. Le test sérologique rapide (immunochromatographique) détectant des anticorps dirigés contre l'antigène rk 39, semble répondre à ces exigences. Son évaluation sur les sérums positifs de l'Inde, Népal, Bangladesh, Sudan, Kenya (*L. donovani*), Brésil, Tunisie (*L. infantum*) et en Ethiopie, a montré qu'il est hautement sensible (92%), spécifique (92–98%) et reproductible [36]. Dans cette optique, notre travail consiste à faire une étude comparative des tests de diagnostic de la LV : rk39, ELISA, PCR, et examen direct dont l'objectif est l'évaluation du test immunochromatographie rk39 dans la détection précoce de la LV.

Objectif de l'étude :

Evaluer la sensibilité et la spécificité du test immunochromatographique rk39 dans le diagnostic de la LV en le comparant avec les autres tests du diagnostic : l'examen microscopique direct, la méthode sérologique ELISA et la PCR.

GENERALITES

A-Epidémiologie de la leishmaniose viscérale infantile.

1-Dans le monde

On décrit la LV dans 61 pays sur 4 continents, où environ 200 millions de personnes sont exposées au risque. Son incidence à l'échelle mondiale est de 500 000 cas par an, dont 90 % sont recensés dans seulement 5 pays : Inde (près de 90 % des cas mondiaux dans le seul état du Bihar), Népal, Bangladesh, Soudan, Brésil. La leishmaniose se contracte dans tous les pays et les îles de la mer Méditerranée. Dans les pays du Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie), elle est observée dans 95 % des cas chez des enfants [12] [22].

2-Au Maroc

Au Maroc, comme dans la plupart des pays du pourtour méditerranéen, les leishmanioses constituent un important problème de santé publique. La situation est devenue préoccupante dès les années 1970 et continue à l'être jusqu'à nos jours[7]. Avec les aménagements hydrauliques, la surpopulation, les migrations..., la maladie a pris beaucoup plus d'ampleur ces dernières années, et on a noté l'émergence de nouveaux foyers leishmaniens (figure 1).

Trois zones ont été précisées comme étant particulièrement exposées [3] :

- **Zone nord** : Comprenant le pré-rif et le rif dans un axe allant de Nador à Taza en passant par El Hoceima, Tétouan, Tanger et Taounate.
- **Zone centre** : Comprend les villes de Meknès, Fès, Sidi Kacem et Rabat, ce qui touche en partie les plaines du Saïs, du Gharb et Atlantique.
- **Zone sud** : Touchant la région d'Errachidia.

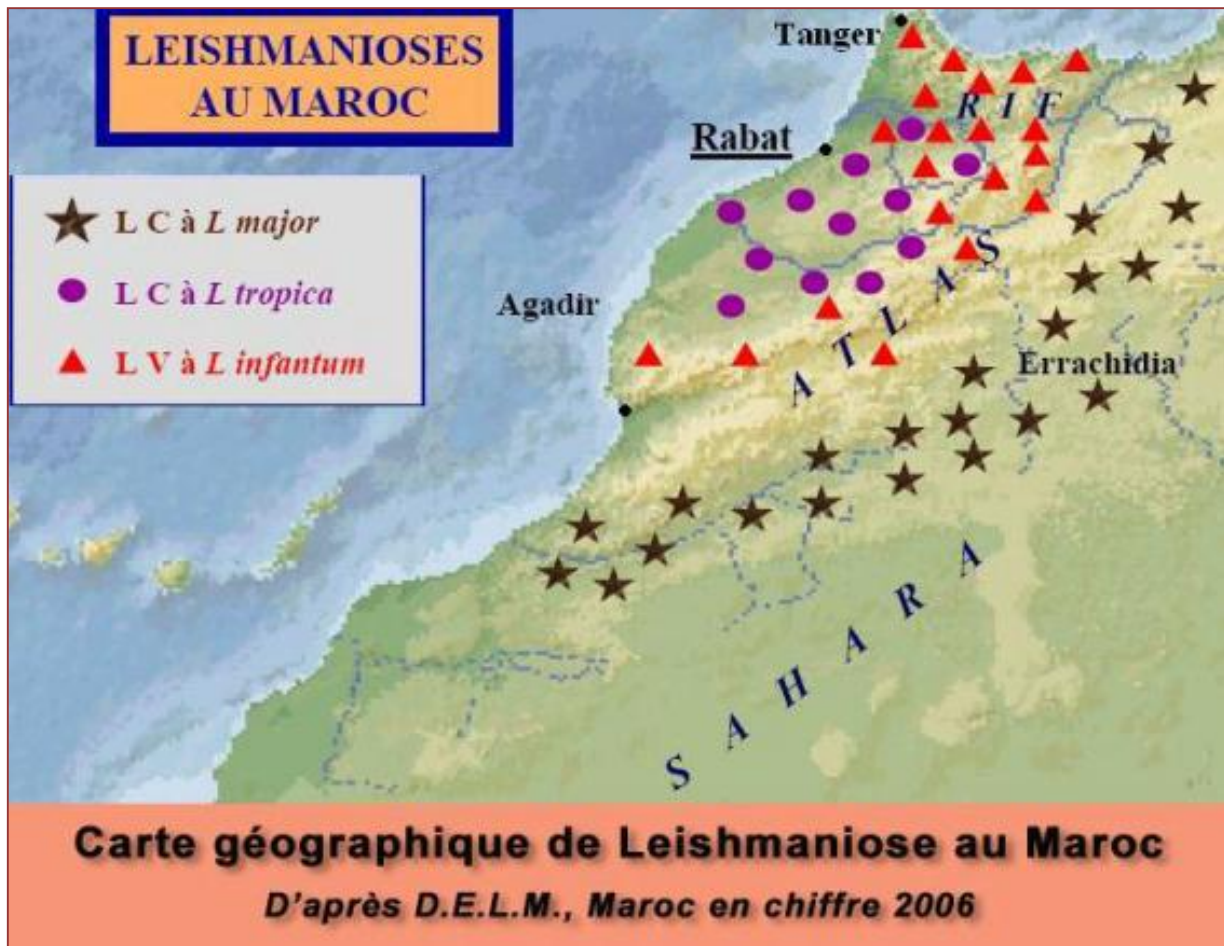


Figure 1 : répartition de la leishmaniose viscérale au Maroc [7]

Avant 1993, l'absence d'un système de recueil de l'information épidémiologique concernant les leishmanioses fait que les données disponibles ne reflètent guère la situation épidémiologique réelle. Entre 1994 et 1999, en tenant compte des déclarations de cas faites par les provinces et préfectures durant cette période, la situation des différentes leishmanioses peut être illustrée en trois entités épidémiologiques: la leishmaniose cutanée zoonotique à *L. major*, leishmaniose cutanée anthroponotique à *L. tropica* et leishmanioses cutanée et viscérale à *L. infantum*. [6]

Malgré que la leishmaniose viscérale est devenue une maladie à déclaration obligatoire, son incidence au Maroc reste sous estimée du fait de la difficulté d'accès aux soins de certaines populations ou par le manque de déclaration de tous les cas de leishmaniose viscérale observés [1]

B-Biologie du parasite

1- Identification d'espèce

Les leishmanies sont des trypanosomatidae kinitoplastidaie se présentant sous deux formes distinguées selon qu'il s'agit de l'hôte mammifère ou de l'insecte vecteur :

* **La forme promastigote** est extracellulaire, mobile, vit dans le tube digestif des diptères hématophages piqueurs, elle se présente sous forme d'un corps plus ou moins fuselé de 5 à 20 μ m de longueur et 1 à 4 μ m de largeur, prolongé par un flagelle d'environ 20 μ m de longueur (figure 2).

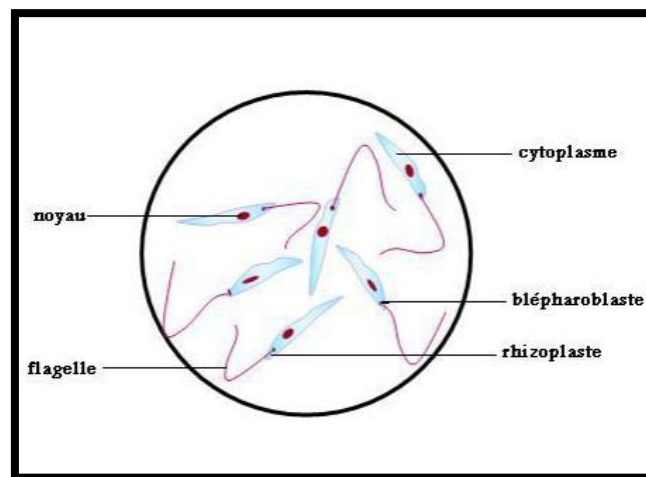


Figure 2 : Forme promastigote[6]

* **La forme amastigote** niche à l'intérieur des macrophages des mammifères, au sein de vacuole parasitophore; elle se présente sous forme d'un corpuscule de 4 μ m de long et de 2 μ m de large, d'un flagelle récurrent mais ne dépassant pas le corps cellulaire (figure 3).

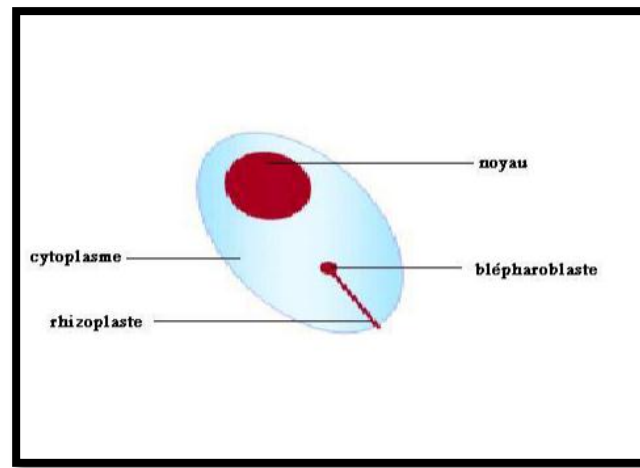


Figure 3 : Forme amastigote[6]

Cette classification repose sur des critères morphologiques. Cependant les sous divisions du genre *leishmania* en espèces ou en sous espèces nécessitent un typage enzymatique ou moléculaire. En effet il est impossible de différencier les leishmanies par leur morphologie, aussi bien au microscope optique qu'électronique. Grâce au polymorphisme important exprimé chez les genres *leishmania*, l'électrophorèse des iso-enzymes constitue aujourd'hui la méthode la plus courante pour l'identification des souches de *leishmania* au niveau spécifique ou infra-spécifique, déterminant ainsi des zymodèmes caractéristiques de chaque espèce. Pour la leishmaniose viscérale, les complexes à tropisme viscérale sont : le complexe *L. Donovan* (*L. Donovan Donovan*, *L. Donovan Archibaldi*) et le complexe *L. infantum* (*L. Donovan Infantum*, *L. Donovan Chagasi*) [4]

2.Vecteur

Le phlébotome (Fig. 4) est le seul vecteur connu des leishmanioses. La focalisation de ces infections dépend étroitement de la distribution de ces insectes.

Les phlébotomes sont des diptères hématophages présentant un corps grêle et allongé de petite taille, de 1 à 3 mm de long. Le corps d'une couleur jaune terne,

ainsi que les ailes ont un aspect velu. La tête forme un angle de 45° avec le corps donnant à l'insecte une allure bossue.



Figure 4: **Phlebotomus** femelle en train de prendre son repas sanguin [6]

3. Cycle parasitaire [8]:

Le cycle de la leishmaniose (Figure 5) est un cycle hétéroxène présentant deux hôtes :

- un hôte invertébré (phlébotome)
- un hôte vertébré (Homme, chien, renard...).

C'est au cours du repas sanguin pris sur un animal ou un sujet infecté que le phlébotome absorbe les macrophages chargés des leishmanies. La rupture des cellules hôtes intervient au cours de l'ingestion et les amastigotes sont libérées. Ces derniers se multiplient sous la forme promastigote dans l'intestin du vecteur. Les leishmanies après 4 à 7 jours gagnent les pièces buccales du vecteur qui devient infestant capable de transmettre le parasite à un autre animal ou à l'homme. Les promastigotes « injectés » seront transformés en amastigotes lors de leur passage en phagolysosome, dans lesquels ils se multiplieront entraînant

la lyse cellulaire successive des macrophages du sang ou de la peau de l'hôte vertébré.

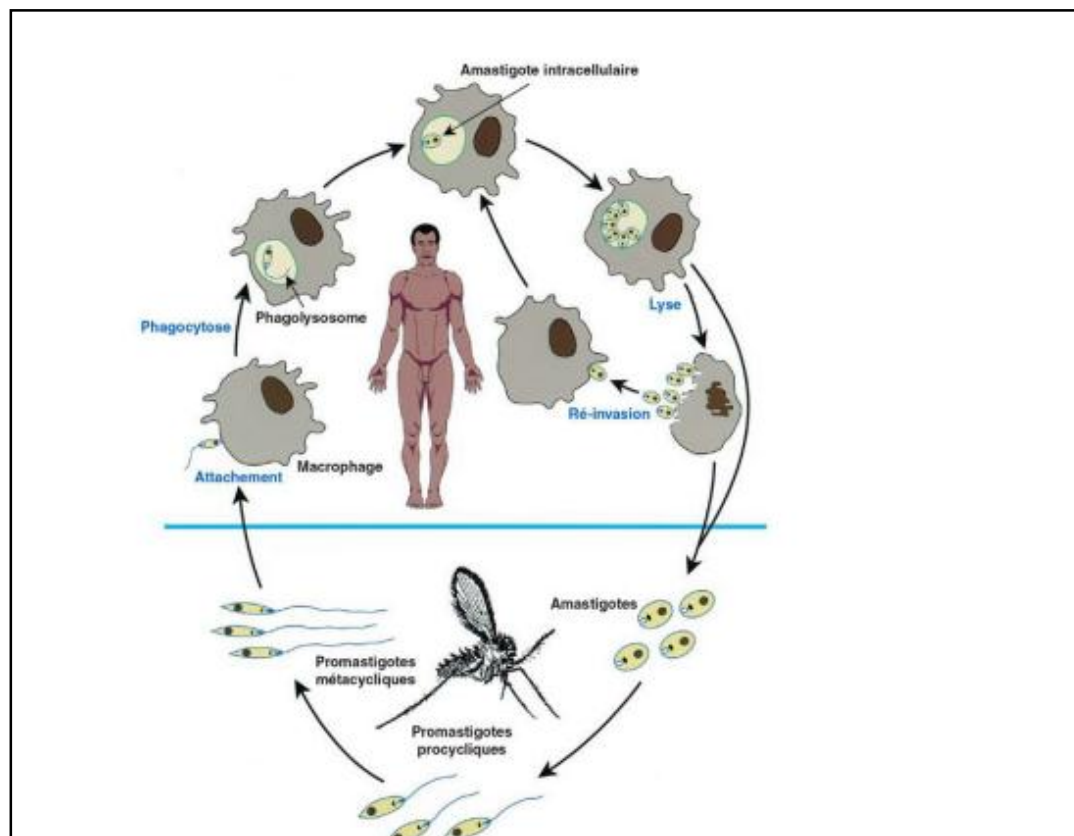


Figure 5. Cycle parasitaire de la leishmaniose[4]

C – Immunité anti leishmanienne [9] [10] [11][13]

1 – Immunité humorale [11]

L'activation du complément permet la formation des complexes immuns circulants faisant intervenir les Immunoglobulines : IgA, IgG et IgM. Ces anticorps ne sont pas très importants dans la défense contre le Kala-azar, car les formes à sérologie négative en IFI ne sont pas plus graves que celles où l'on détecte des anticorps.

L'exploitation de l'immunité humorale ne se limite pas seulement au sérodiagnostic, il s'agit d'un indicateur de réponse thérapeutique.

L'augmentation de l'IL4 au cours de l'infection favorise la synthèse des IgE. Le suivi

de la cinétique des IgE en post thérapeutique permettrait d'évaluer la prise en charge du patient [11].

2 – Immunité cellulaire

Lorsqu'elles pénètrent dans l'organisme lors du repas sanguin du phlébotome, les formes promastigotes des leishmanies doivent comme tout autre pathogène faire face à deux mécanismes ancestraux de défense de l'hôte : la lyse par le complément et la destruction par les phagocytes d'une part et le recrutement de la réponse immunitaire cellulaire spécifique mobilisant les lymphocytes CD4+, avec un rôle éventuel des lymphocytes CD8+ d'autre part [10].

L'acquisition d'un pouvoir pathogène se fait chez les phlébotomes au cours de la mutation parasitaire par la modification antigénique capable de rendre l'insecte infectant. En effet, le parasite déjoue les mécanismes de lutte de l'organisme humain par le biais de certaines de ces protéines membranaires comme la lipophosphoglycane (LPG) ou la glycoprotéine GP63. Le système du complément est activé, mais ses fractions tardives ne peuvent plus exercer leur activité lytique. En outre, l'opsonisation des leishmanies permet leur interaction avec les macrophages. La présentation des antigènes parasitaires par le complexe majeur d'histocompatibilité et par les systèmes de co-stimulation est modifiée. Les phénomènes de coopération cellulaire entre macrophages et lymphocytes T CD4+, visant à contrôler la maladie, passent par la juste différenciation de deux sous populations T helper (Th), l'une favorisant l'implantation parasitaire (Th2), l'autre la combattant (Th1) en produisant l'interféron γ (INF γ) qui joue un rôle crucial pour la guérison.

D-Diagnostic clinique [1] [2] [4] [5] [12] [13]:

1-Incubation :

La période d'incubation moyenne est de 3 à 6 mois, mais on a pu observer des périodes de durées extrêmes allant de 10 jours à 3 ans [13]. Cette période est généralement silencieuse.

2-Phase d'invasion :

Selon les cas, le début de la maladie peut être progressif, ou au contraire soudain et brutal. Cependant, chez tous les patients, le signe le plus constant et le plus précoce est la fièvre. Généralement l'état général, et l'appétit sont bien conservés durant cette période.

3-Phase d'état :

Habituellement, les signes observés sont les suivants : fièvre, anémie, amaigrissement et, conséquence de l'atteinte des phagocytes mononucléés : splénomégalie, hépatomégalie. La fièvre est intermittente, irrégulière ou avec double pic toutes les 24 heures. Elle survient par vagues de plusieurs semaines entrecoupées de phases d'apyrexie. L'anémie est révélée par une pâleur intense et une décoloration des muqueuses. L'amaigrissement du patient est particulièrement visible au niveau des membres contrastant avec une distension abdominale due à l'hépto-splénomégalie. La splénomégalie est quasiment toujours présente à la phase d'état, elle est généralement de très grosse taille. L'hépatomégalie, elle, est moins fréquente et plus modérée. Des micropolyadénopathies superficielles et profondes peuvent exister mais de façon inconstante. De plus, le tableau peut se compliquer de signes digestifs, pulmonaires, et de manifestations hémorragiques.

On note de plus en plus, le caractère opportuniste de cette maladie lié à l'immunodépression, dans ce cas, la viscéralisation va s'étendre à des viscères habituellement peu atteints. Il s'agit soit d'une infection primaire, soit de réactivation d'une infection latente.

E-Diagnostic biologique [12] [13]

1-Arguments d'orientation :

Les signes biologiques d'orientation sont une pancytopénie plus ou moins prononcée associant anémie, leuconéutropénie et thrombopénie ainsi qu'un syndrome inflammatoire: vitesse de sédimentation globulaire très accélérée, hyperprotidémie et hypergammaglobulinémie polyclonale.

La positivité de la sérologie induit une très forte présomption diagnostique. La technique de référence reste l'immunofluorescence indirecte sur formes promastigotes de culture, qui est de plus en plus supplantée par les tests ELISA, dont la spécificité et la sensibilité varient beaucoup selon les antigènes utilisés. Le DAT (Direct Agglutination Test, qui est peu coûteux et qui ne nécessite pas de matériel sophistiqué, est de plus en plus utilisé sur le terrain, tout comme les tests rapides immunochromatographiques (dipstick) utilisant des bandelettes sensibilisées par une protéine antigénique recombinante. L'immunoempreinte, ou Western-Blot, très sensible et très spécifique, permettant de différencier les sujets malades des porteurs asymptomatiques, est le test de confirmation réservé aux laboratoires spécialisés.

2 – Arguments directs

Classiquement, le diagnostic de certitude nécessite un prélèvement de moelle osseuse. Mais la leucocentrifugation à partir d'un prélèvement de sang périphérique

peut permettre le diagnostic de certitude, avec toutefois plus de chances de visualiser des parasites si le malade est particulièrement immunodéprimé. Enfin, des biopsies digestives ou cutanées ainsi que des lavages broncho-alvéolaires sont à l'origine d'un diagnostic fortuit ou de localisations inhabituelles chez 30 % des malades séropositifs pour le VIH.

Le diagnostic moléculaire est fondé sur la détection et l'analyse des acides nucléiques du parasite dans la moelle osseuse ou, plus facilement, le sang. Il complète les approches parasitologiques et sérologiques dans le cadre du diagnostic initial, mais il est surtout utile pour le suivi post-thérapeutique et pour l'étude des sujets porteurs asymptomatiques du parasite.

MATERIELS

ET METHODES

1–Type, période et lieu de l'étude:

Il s'agit d'une étude prospective monocentrique continue, entamée depuis Février 2015, concernant les patients hospitalisés au service de pédiatrie CHU Hassan II de Fès pour suspicion d'une leishmaniose viscérale.

2–Critères d'inclusion :

Nous avons retenu comme critères d'inclusion : Tout patient âgé de moins de 15 ans hospitalisé pour un tableau clinique évocateur de leishmaniose viscérale infantile, ayant bénéficié d'un prélèvement sanguin et médullaire dans le but de confirmer ou d'affirmer le diagnostic de leishmaniose viscérale.

3–Méthodologie et collecte des cas :

Le recueil des données a été effectué à l'aide de dossier médical de chaque patient. Tous les patients répondant aux critères d'inclusion étaient l'objet d'une enquête renseignant sur l'âge, sexe, signes fonctionnels, délai de consultation, données de l'examen clinique, et données biologiques (hémogramme, VS, CRP, protidémie, EPP, bilan hépatique...).

Pour chaque patient nous avons réalisé :

- Un prélèvement périphérique de 5 ml de sang pour la réalisation des tests sérologiques : EILSA et rk39 afin d'évaluer la sensibilité et la spécificité du test rapide.
- Une ponction médullaire pour le diagnostic microscopique direct sur frottis et la PCR afin de confirmer le diagnostic sérologique.

Les prélèvements sont adressés à l'institut national d'hygiène de rabat le jour même de leur réalisation, et les résultats nous sont délivrés dans les 72 heures qui suivent par Fax.

4-Description des différents examens de certitude utilisés chez nos patients.

a-Examen microscopique direct

Les ponctions médullaires chez tous nos patients sont réalisées au niveau de la crête iliaque sous sédation, Une partie du sang médullaire aspiré est d'emblée étalée sur des lames afin de réaliser un frottis (l'autre partie est préservée dans un tube EDTA pour la PCR).

Le frottis est fixé et coloré par la méthode de May-Grünwald-Giemsa (MGG). L'examen au microscope permet de visualiser les parasites sous leur forme amastigote de 2 à 5 μm intra ou extracellulaire après éclatement des cellules hôtes. Le noyau est rond ou ovalaire et plus petit.

La ponction médullaire permet également d'apprécier la richesse de la moelle osseuse et d'éliminer un envahissement par des cellules tumorales hématopoïétiques notamment une leucémie aigue, ou extra hématopoïétique.

b-La culture

Le prélèvement peut être ensemencé en culture sur gélose au sang : milieu NNN (Novy, McNeal, Nicolle) ou un équivalent (milieu de Schneider) incubé entre 24 °C et 28 °C. La culture est lente et peut nécessiter trois repiquages à 1 semaine d'intervalle avant de conclure à une négativité. Le parasite est, en culture, sous forme promastigote flagellée et mobile.

La culture permet de rendre plus sensible le diagnostic parasitologique, d'identifier précisément le parasite (profil iso-enzymatique, phénotype, génotype) et de tester la sensibilité des souches aux leishmanicides.

c-Recherche par amplification génique (PCR) :

L'amplification et la détection de l'ADN parasitaire par PCR, méthode sensible, spécifique et rapide, Elle permet un diagnostic de genre, de sous genre voir d'espèce.

Elle s'effectue à partir de tout prélèvement. Chez nos patients, la PCR est réalisée sur sang médullaire.

d – Diagnostic immunologique

La leishmaniose viscérale s'accompagne d'une réponse immunitaire humorale, avec apparition de titres élevés d'anticorps sériques, qui peuvent toutefois faire défaut chez l'immunodéprimé. La technique immunologique utilisée chez nos patients est l'ELISA.

L'ELISA peut être exécutée sur sérum ou sur un volume de sang précis. Le sang est collecté par piqûre avec une aiguille sur des bandes de papier absorbant approprié et laissé à sécher. L'échantillon est élué et testé à une seule dilution déterminée auparavant pour donner une spécificité et une sensibilité acceptables.

e- Epreuve rapide d'immunochromatographie (dipstick ou strip-test)

Principe du test :

Le test rapide rk 39 est une méthode immunochromatographique permettant une détection qualitative des anticorps dirigés contre l'Ag rk 39 qui appartient au complexe leishmania donovani.

Dans notre étude nous avons utilisé le kit IT-Leish(Figure 6), ce kit comprend une bandelette de nitrocellulose contenant un tampon absorbant à une extrémité, une zone avec un anticorps anti-protéine A fixé dessus (utilisé pour détecter les IgG), à l'autre extrémité (zone témoin), et une zone avec l'antigène rk39

au milieu (zone de réaction). Un conjugué protéine A-or collaïdal est utilisé comme réactif de révélation de la réaction immunochromatographique.



Figure 6 : Bandelettes du test rapide rk 39 (IT leish) utilisées chez nos patients (Institut national d'hygiène Rabat)

✚ Déroulement du test (Figure 7)

Une petite goutte de sérum à tester (20 μ l) est placée sur le tampon absorbant avant d'ajouter deux grosses gouttes de tampon (100 μ l) ; on laisse migrer le mélange le long de la bandelette par capillarité. Le résultat est interprété après 2 à 10 min.

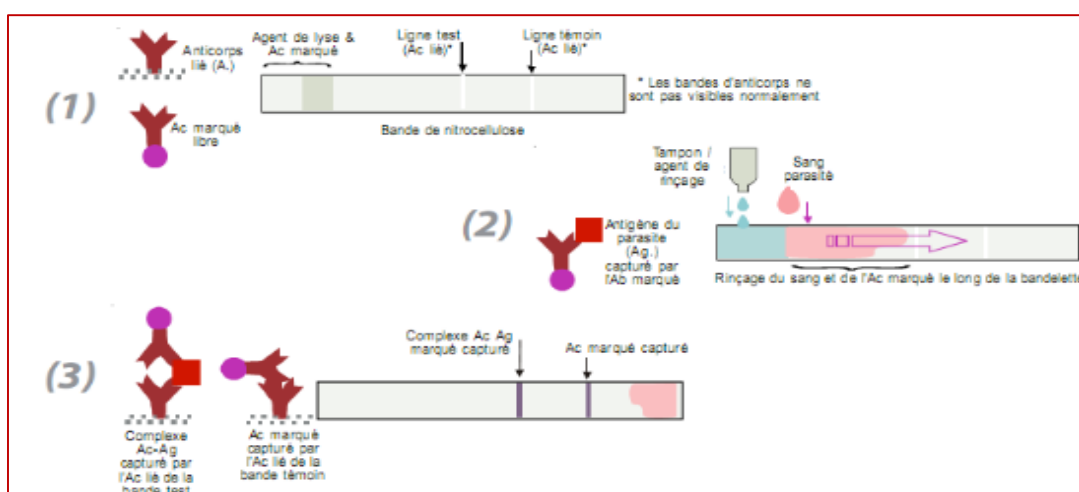


Figure 7: Déroulement du test rapide rk 39[17]

✚ Interprétation des résultats (Figure 8) :

- Le résultat est positif si deux lignes rouges distinctes apparaissent : une dans la zone de réaction et l'autre dans la zone témoin.
- Il est négatif si aucune ligne n'apparaît dans la zone de réaction
- Il est ininterprétable si une ligne n'apparaît pas au niveau de la zone témoin.

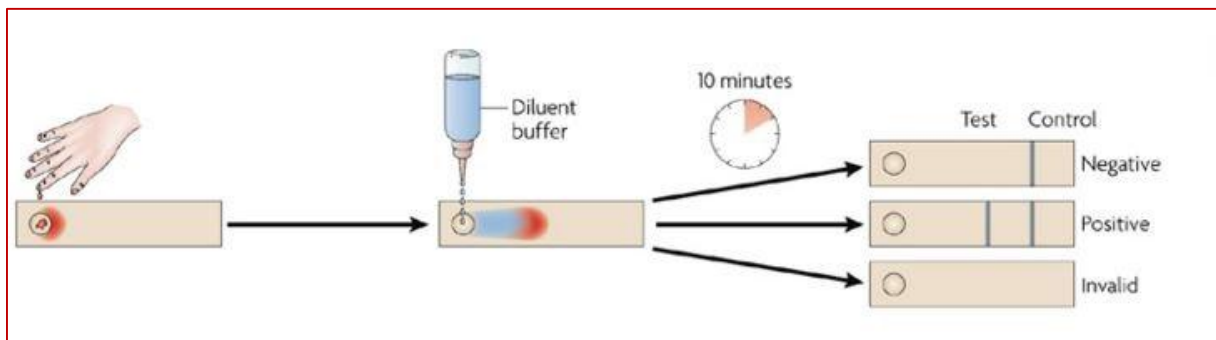


Figure 8 : Interprétation des résultats du test rapide rk 39[17]

RESULTATS

I-Tableau récapitulatif des observations

Nom+Prénom sexe Mois/Année	Age	Origine géographique	Délai de consultation	Signes fonctionnels + examen physique	Examens complémentaires de présomption	Examens de certitude				Traitement	Diagnostic retenu + Evolution
						Ex. direct	rk 39	ELISA	PCR		
1-L.Y (M) 02/2015	2 ans et demi	Fès	20 jours	-Fièvre -Asthénie -AEG -Distension abdominale -SMG arrivant à l'ombilic.	-Pancytopenie arégénérative -Ferritinémie : 364 -Protidémie : 83 -VS :112/142 -CRP : 50 -EPP : hypoalbuminémie avec hypergammaglobulinémie	+	+	+	+	Glucantime Antibiothérapie	Leishmaniose viscérale Résistance au glucantime
2-B.O (F) 03/2015	5 ans et demi	Boulemane		-Fièvre -Asthénie -Pâleur cutanéomuqueuse -SMG à 2TDD -HMG FH 9cm	-Anémie normochrome, normocytaire aérégénérative -VS :9/18 -prot=63 -EPP : hypogammaglobulinémie -Medullogramme : erythroblastopénie -TDM thoracique : thymome -Sérologie parvovirus B19 : positive	-	-	-	-	Programme transfusionnel de CG Thymectomie	Erythroblastopénie Favorable
3-L.B (M) 04/2015	4 ans	Taza	20 jours	-Fièvre -Distension abdominale -Splénomégalie -pâleur	Pancytopenie VS : 75/120 CRP :110 Protidémie :80 Albuminémie :25	+	+	+	+	Glucantime	Leishmaniose viscérale Favorable
4-K. M (F) 04/2015	6 mois	Taounat	20 jours	-Toux -Fièvre -pâleur -distension abdominale -ADP lenticulaires ss maxillaires et inguinales -SMG 3 TDD	Pancytopenie arégénérative -VS :80/160 -CRP :110 -prot :73 Ferritinémie :292 -syndrome d'activation macrophagique erturbé : ferritinémie à 1130 TG:3.29	+	+	do ut eu x	+	Transfusion CG et CP Glucantime Corticothérapie	Leishmaniose viscérale Syndrome d'activation macrophagique puis favorable 2ème, hospitalisation pour résistance à la Glucantime

5-B. I (M) 04/2015	M 5 ans	Tbouda	Un mois	-Syndrome -hémorragique -Fièvre -Altération de l'état général	-Pancytopenie. arégénérative -Protodémie : 73. -Albumine : 44. -VS :45/99 -CRP :15 -Sérologies virales:négatives -BOM :moelle hypoplasique	-	-	-	-	Programme transfusionnel CG, CP Corticothérapie	Aplasie medullaire Suivi en hémato- pédiatrie
6-L.I (F) 04/2015	20 mois	Fès	15 jours	-Fièvre à 40 -Pâleur -Dlr abdominales+ Constipation -Distension abdominale -SMG à 3 TDD	-Pancytopenie -CRP :139 -VS :60/100 -Protide :64 -Albumine :36 -Bilan d'activation macrophagique : négatif	+(ra re)	+	D ou te ux	+	Glucantime Antibiothérapie	Leishmaniose viscérale Favorable
7-A.M (F) 04/2015	F 3 ans	Taounat	1 an	-Distension abdominale -Fièvre prolongée -CVC -HMG 2 TDD -SMG 8 TDD	-Pancytopenie -Prot :78 -Albu :48 -LDH :217 -VS : 30/75 -CRP :3 -EPP : normal -Echographie+TDM abdominale : maladie de caroli	-	-	-	-	C3G Avlocadryl	Maladie de caroli Suivie en consultation des anciens malades
8-A.A (F) 04/2015	16 mois	Imouzzar	Un mois	-Toux, fièvre, -vomissements -Amaigrissement -Pointe de rate	Pancytopenie arégénérative VS a 75 mm / 122 mm albumine à 32 avec protidémie à 74 fibrinogène bas à 1.01	+ rare s	+	D ou te ux	+	Glucantime pdt 21 jours	Leishmaniose viscérale Favorable
9-F.W (F) 05/2015	2 ans et demi	Régions de ouazzane	3mois	-Distension abdominale -Fièvre -HMG à 3 TDD -SMG dépassant l'ombilic	-Pancytopenie arégénérative -CRP :123 -VS :121/142 -Protidémie :90 -Albumine :26 -Fibrinogène:1.45 -Ferritinémie:146 -Bilan lipidique : hypertriglycémie -Echographie abdominale : HSMG	+ rare s	+	+	+	Glucantim Antibiotérapie large spectre Transfusion de CG	Leishmaniose viscérale Favorable

10-T.S (F) 06/2015	4 ans	Errachidia	45 jours	-Fièvre -AEG -Distension abdominale -SMG 2TDD -HMG FH à 11.5cm -Poly ADP cervicales, sous mandibulaires et axillaires dont la plus gde 2 cm	-Pancytopenie arégénérative -CRP :155 -LDH:447- Ac urique: 24 -Calcium :106 -K+:4.9- NA:136 --fonction renale correcte --Alb :38 prot:76 -Echo abd : HSMG homogène -Medullogramme : LALB	-	-	-	-	Chimiothérapie	Leucémie aigue lymphoblastique Suivie en onco-pédiatrie
11-A.M (M) 06/2015	14 mois	Taounat	1 mois	-Distension abdominale -Pâleur -Amaigrissement -Fièvre -SMG arrivant à l'ombilic -HMG	-Pancytopenie -CRP :202 -VS :56/101 -Protidémie 68 -Syndrome d'activation macrophagique perturbé :ferritinémie : 4787 LDH :1143 TG :3.29	+	+	+	+	Glucantime corticothérapie Antibiothérapie large spectre Transfusion par CG	Leishmaniose viscérale Syndrome d'activation macrophagique puis évolution favorable Perdu de vue après sa sortie
12-J .M (F) 09/2015	2 ans mois	Taounat	3 mois	-Gingivo stomatite -Fièvre -Syndrome hémorragique (taches purpuriques) -SMG à l'ombilic -HMG FH à 9 cm -Rales ronflants avec syndrome de condensation pulmonaire droit	-Pancytopenie -CRP :208 -TP :48% -VS :45/89 -Albumine :20 : -Ferritinémie : 1806 -Rx thorax : poumon droit blanc -Echographie -abdominale : HSMG homogènes -Hémoc positive à streptocoque pneumoniae	+	+	+	+	Transfusion CG et CP Antbithérapie amoxicilline+macrolide	Leishmaniose viscérale Trb de conscience avec DR puis décès
13-L.M (M) 09/2015	12 mois ATCD : décès dans la fratrie meme contexte Cs 2ème degré	Taounat	5 mois	-Fièvre -Distension abdominale -Diarrhées -Paleur -SMG à 4 TDD -HMG avec FH à 9cm	-Anémie microcytaire normochrome +thrombopénie -CRP :19 -VS : 27/58 -Ferritinémie :67 -Protidémie : 79 -Albuminémie :47 -Dosage de la glucocérébrosidase demandé mais non fait -Etude génétique en cours	-	-	-	-	RAS	Suspicion de maladie de Gaucher Suivi en consultation des anciens malades

14-A.M (M) 09/2015	10 ans	Nador	3 mois	-Fièvre -Douleurs abdominales -ADP cervicales	-Anémie hypochrome, microcytaire+lymphopénie -CRP :202 -VS :120/160 -Ferritinémie :1230 -TDM TAP : ADP sus et sous diaphragmatiques. -Biopsie d'ADP :lymphome de hodgkin -BOM : envahissement médullaire	-	-	-	-	Chimiothérapie	Maladie de hodgkin Suivi en onco pédiatrie
15-CH.R (F) 12/2015	6 ans	Fès	Un mois	-Fièvre -AEG -Douleurs abdominales -Vomissements -Diarrhées liquidiennes -Crises hypertoniques	-Pancytopenie arégénérative -CRP :6 -VS :45/86 -PRot :60 -Albumine : 26	-	-	-	-	Antibiothérapie	Fièvre typhoïde
16-O.A (M) 01/2016	12 mois	Errachidia	20 jours	-Fièvre -Diarrhées intermittentes+vss -ADP centimétriques cervicales, axillaires, et inguinales	-pancytopenie -CRP :43 -VS : 11/24 -ferritinémie :1201 -LDH :2048 -TG :9.06 GOT /GPT :141/21	-	-	-	-		Syndrome d'activation macrophagique

II-Tableau montrant de façon comparative les résultats des examens de certitude utilisés chez nos patients :

Nom du patient (sexe)		Examen direct	Test rapide rk 39	ELISA	PCR
1-L.Y	Prélèvement N°1(02/15)	+	+	+	+
	Prélèvement N°2(03/15)	+ (rares)	+	+	+
	Prélèvement N°3(04/15)	+ (très rares)	+	+	+
2-B.O (03/15)		-	-	-	-
3-L.B (04/15)		+	+	+	+
4-K.M	Prélèvement N° 1 (04/15)	+	+	Douteux	+
	Prélèvement N°2(12/15)	+	-	+	+
5-B.I (04/2015)		-	-	-	-
6-L.I (04/15)		+ (rare)	+	Douteux	+
7-A.M (04/15)		-	-	-	-
8-A. A (04/15)		+ rare	+	Douteux	+
9-F.W (05/15)		+ (rare)	+	+	+
10-T.S (06/15)		-	-	-	-
11-A.M(06/15)		+	+	+	+
12-J.M (09/15)		+	+	+	+
13-L.M(09/15)		-	-	-	-
14-A.M (09/15)		-	-	-	-
15-CH.R(12/15)		-	-	-	-
16-O.A (01/16)		-	-	-	-

A– Résultats descriptifs :

1– Données épidémiologiques

- **Nombre de cas:**

Dans le cadre de la présente étude, nous avons réalisé 19 prélèvements sanguins et médullaires chez 16 patients hospitalisés pour suspicion de leishmaniose viscérale.

Deux patients ont présenté une leishmaniose viscérale résistante au Méglumine antimoniate (Glucantime®), raison pour laquelle ils sont hospitalisés à plusieurs reprises, et ils ont bénéficié de prélèvements à chaque hospitalisation pour confirmer le diagnostic et quantifier la charge parasitaire.

- **Fréquence de la leishmaniose viscérale infantile :**

La leishmaniose viscérale infantile représente 0.7% de l'ensemble des hospitalisations dans notre service durant la période de notre étude.

- **Sexe**

Nos patients sont répartis en 9 filles et 7 garçons avec un sex ratio (G/F) de 0.77.

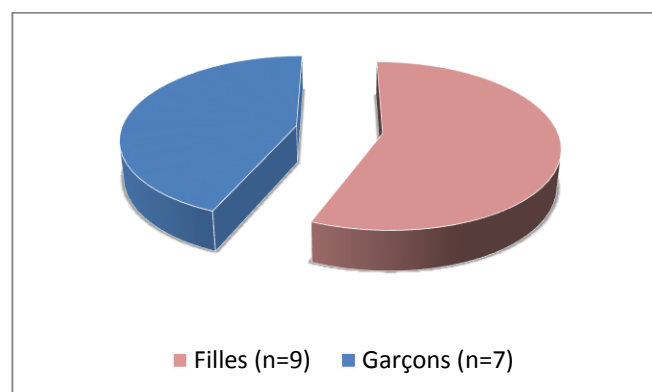


Figure 8 : Répartition de nos patients selon leur sexe

- **Age :**

Le nourrisson et le petit enfant sont les plus touchés par la maladie. L'âge moyen chez nos patients est de 3.2 ans avec des extrêmes allant de 6 mois à 10 ans. La tranche entre 2 et 5 représente 43%.

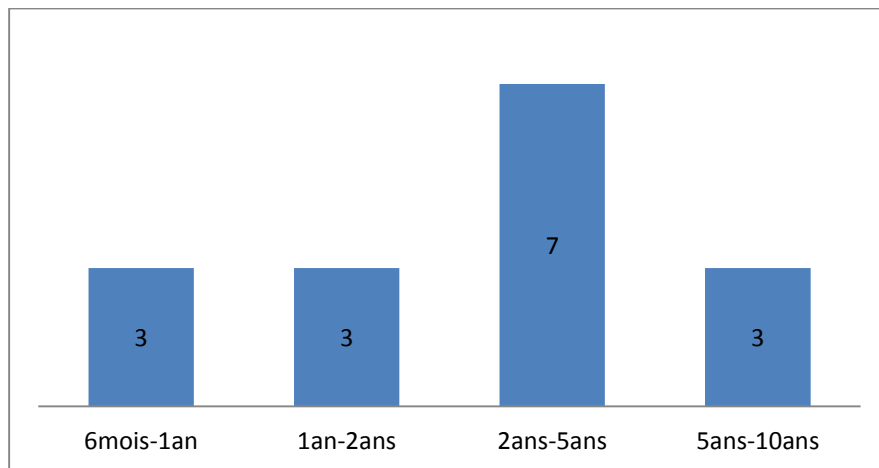


Figure 9 : Nombre des patients en fonction de leur tranche d'âge

- **Origine géographique :**

Nos patients proviennent essentiellement de Taounate (32%), Fès (19%) et Errachidia (13%).

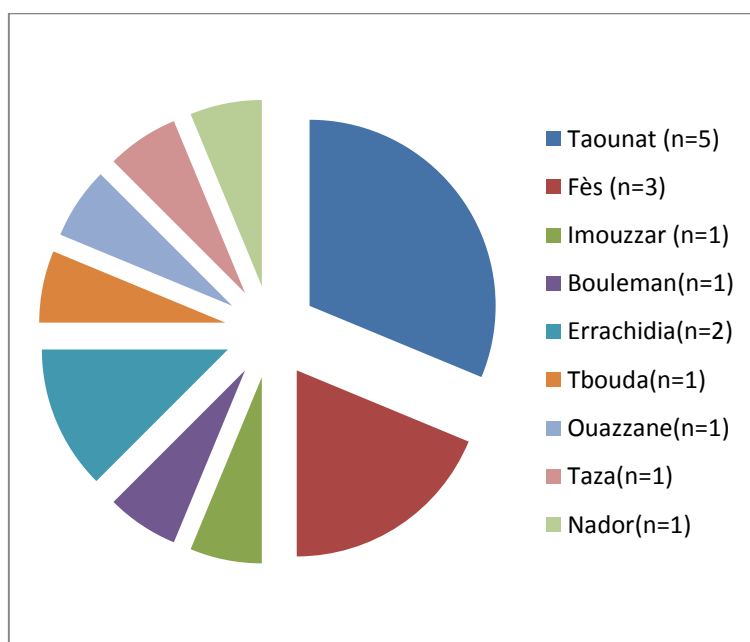


Figure 10: répartition des nos patients en fonction de leur origine géographique

2-Données cliniques :

- **Délai de consultation :**

Le délai de consultation après l'apparition des premiers signes de la maladie varie entre 2 semaines et 1 an avec une moyenne d'environ 66.25 jours soit 2,2 mois.

- **Motif de consultation :**

Des signes généraux de la maladie ont été rapportés chez la plupart des patients, en particulier la fièvre dans 62% des cas. Elle représente le motif de consultation le plus fréquent suivie de la pâleur (43%) et la distension abdominale (25%). Le graphique suivant met en évidence les principaux motifs de consultation dans notre série :

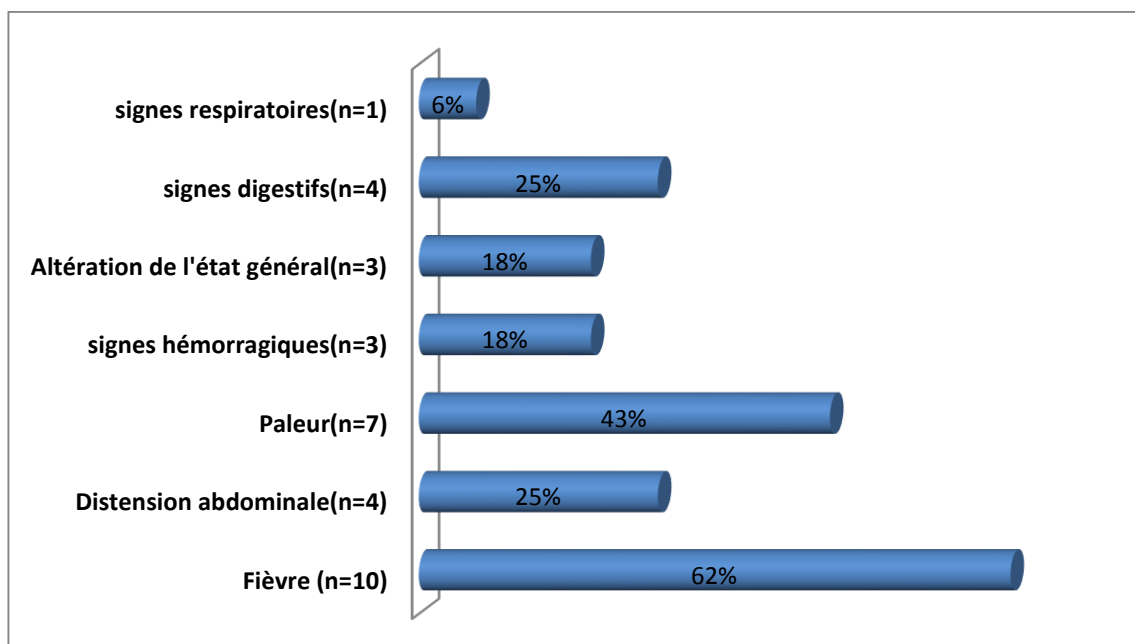


Figure 11 : Répartition des patients en fonction du motif de consultation

- **Examen physique :**

Les signes physiques à l'admission sont représentés par :

- La fièvre : retrouvée chez tous nos patients.
- La pâleur cutané-muqueuse d'intensité variable a été mise en évidence chez 14 patients soit 87.5% .
- La splénomégalie : présente chez 12 patients. Elle va d'un simple débord costal à la présence d'une énorme rate dépassant l'ombilic jusqu'à la fosse iliaque gauche.
- L'hépatomégalie était retrouvée chez 7 patients. Elle est lisse, ferme, indolore et modérée par rapport à la splénomégalie.
- Les adénopathies retrouvées (5 patients) sont de localisation variable, cervicales, sous maxillaires et inguinales, la plus grande mesure 2cm retrouvée chez une patiente (obs N°11) chez qui nous avons retenu le diagnostic de leucémie aigue lymphoblastique.
- Une altération de l'état général faite d'asthénie et d'amaigrissement est retrouvée chez 9 patients soit 56% des cas.
- Le syndrome hémorragique est objectivé chez 3 patients.

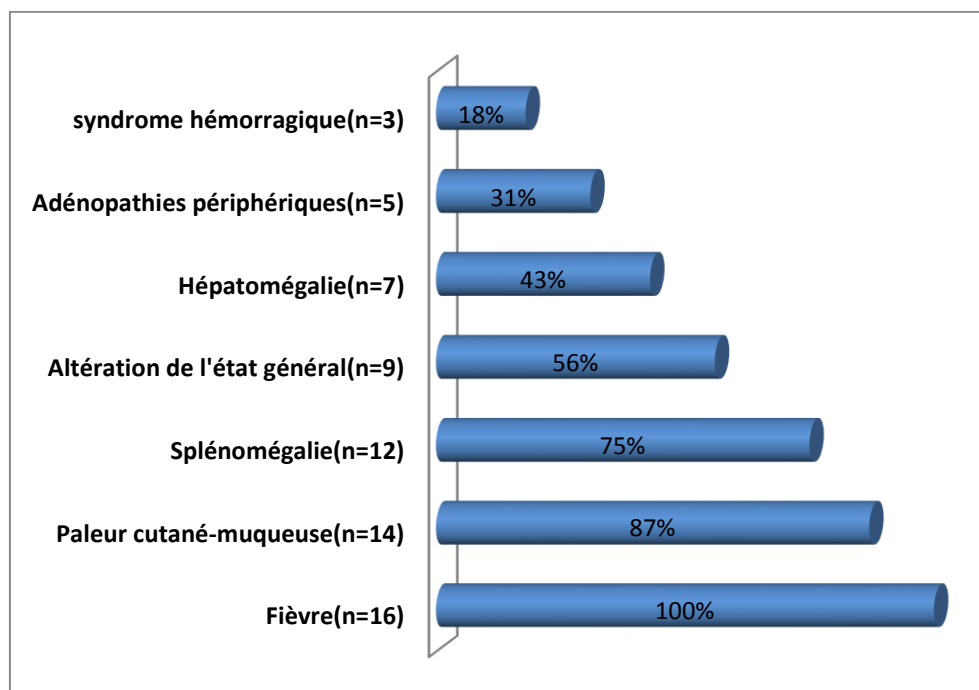


Figure 12 : Répartition des cas en fonction des données de l'examen physique

3-Données biologiques :

- **Hémogramme :**

La numération formule sanguine est pratiquée chez tous nos patients.

- 12 patients ont une pancytopenie soit 75% des cas,
- 3 patients ont une bicytopenie : anémie avec thrombopénie (1 cas), anémie et leucopénie (2 cas)
- Une anémie isolée a été retrouvée chez un seul patient.

Le diagramme suivant illustre les données de l'hémogramme chez nos patients :

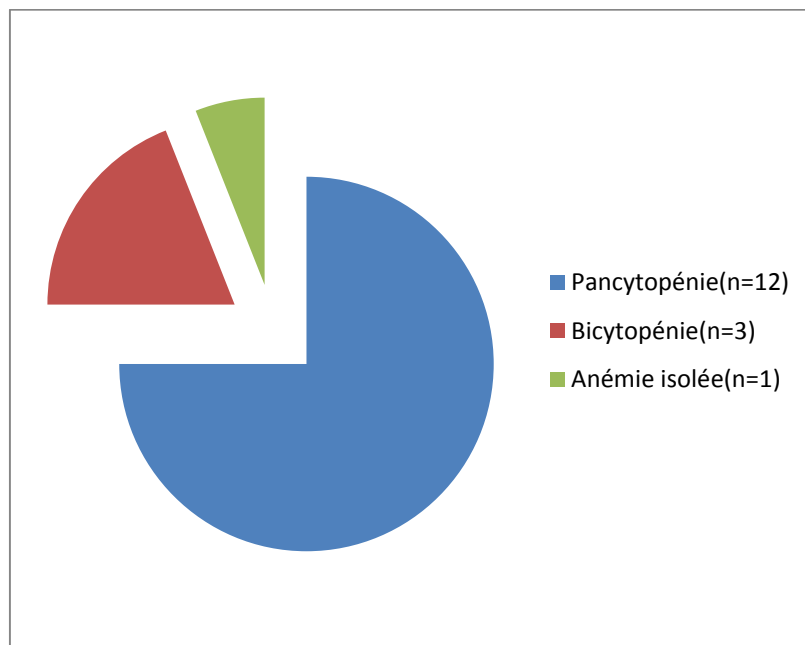


Figure 13 : Répartition des patients selon les anomalies de l'hémogramme retrouvées.

- **Vitesse de sédimentation (VS) :**

La VS est pratiquée de façon systématique chez tous nos patients, le graphique suivant illustre les variations de la VS chez les malades dans notre série :

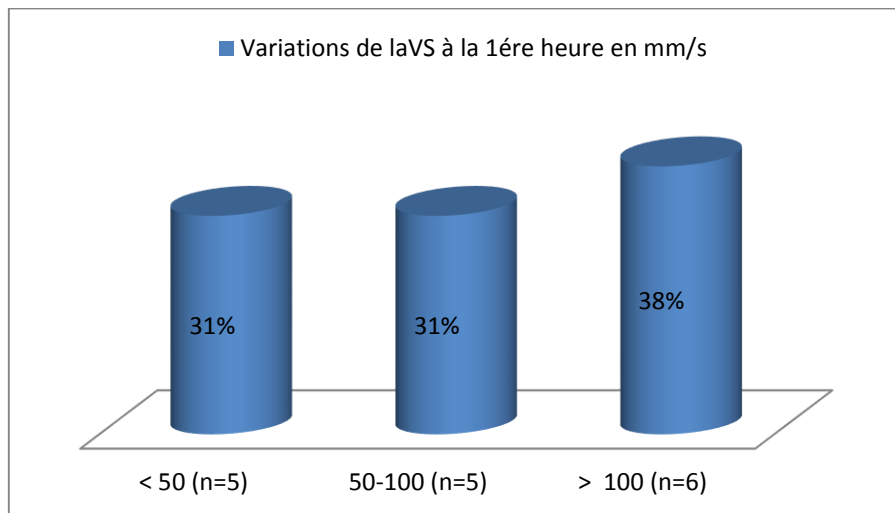


Figure 14 : Répartition des patients en fonction de la valeur de la vitesse de sédimentation la 1ère heure.

- **Protéine-C-réactive :**

Le diagramme suivant illustre les résultats de la CRP chez nos patients :

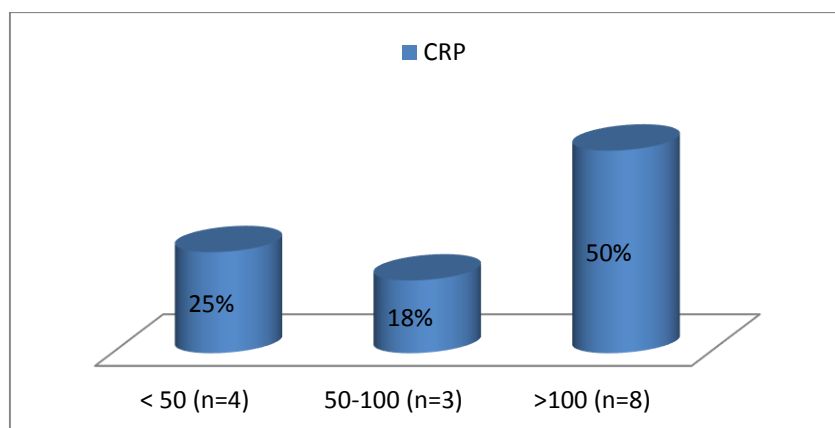


Figure 15 : Répartition des patients en fonction des résultats de la CRP.

- **Electrophorèse des protéines et taux de protides :**

Le taux de protides est demandé chez 11 patients, il a objectivé une hyperprotidémie chez 6 patients.

L'EPP réalisée chez 3 patients a objectivé un profil électrophorétique normal chez un patient, une hypoalbuminémie avec hypergammaglobulinémie chez un cas, et une hypogammaglobulinémie chez un autre.

4-Résultats des examens de certitude :

Tous nos patients ont bénéficié d'un prélèvement périphérique servant aux tests sérologiques : ELISA et test rapide rk39, et d'un prélèvement médullaires pour l'examen direct et la PCR. Ainsi, les résultats du test rapide rk 39 de chaque patient est comparé avec les résultats de l'examen direct, l'ELISA et la PCR.

- **L'Examen microscopique direct :**

La ponction médullaire est réalisée chez tous nos patients sous sédation, les grumeaux de moelle sont récupérés avec une lame de verre et étalés selon la technique des frottis.

L'examen microscopique des frottis a objectivé :

- La présence de nombreux corps de leishmanies chez 6 patients.
- De rares corps de leishmanies chez 4 patients et de très rares corps chez un patient.
- L'absence de corps de leishmanies chez 8 patients.

Le diagramme suivant illustre les résultats de l'examen direct chez nos patients :

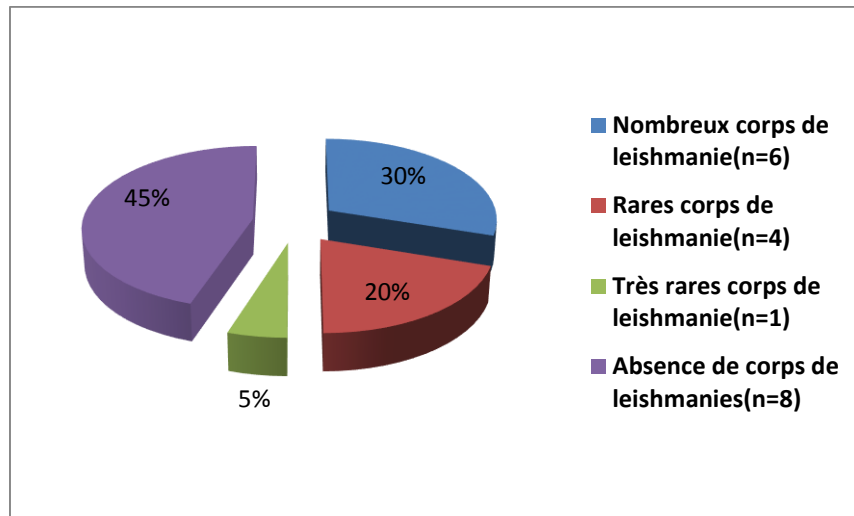


Figure 16 : Répartition des cas selon le nombre de corps de leishmanies objectivés sur le frottis médullaire.

📊 Résultats de l'ELISA :

Le test sérologique ELISA est revenu positif chez 8 patients, douteux chez 3 patients et négatif chez 8 patients

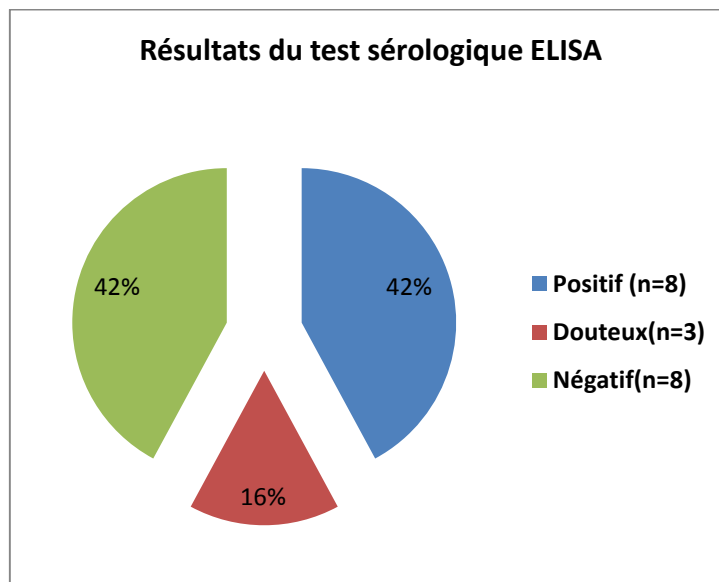


Figure 17 : Répartition des cas selon les résultats de l'ELISA

✚ Résultats de La PCR :

Le diagnostic moléculaire est un excellent outil du diagnostic et du suivi des leishmanioses.

Réalisée de façon systématique chez tous nos patients, la PCR est considérée comme examen de référence dans notre étude grâce à sa haute sensibilité et son excellente spécificité. Elle est revenue positive chez 11 patients et négative chez 8 patients

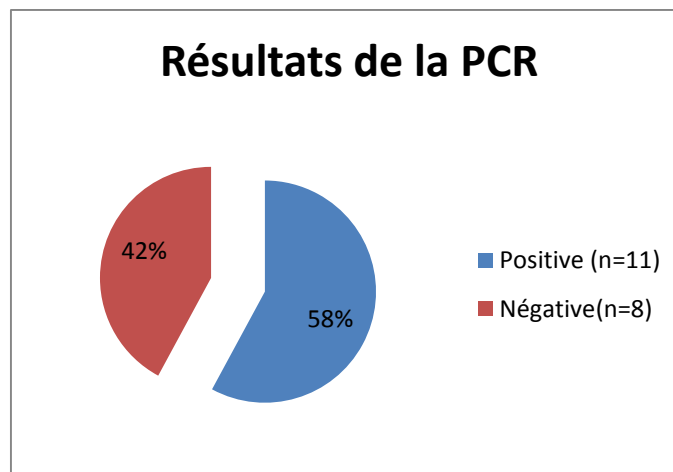


Figure 18: Répartition des cas en fonction des résultats de la PCR

✚ Test rapide rk 39 :

Les résultats du test rapide sont positifs chez 10 patients et négatifs chez 9 patients.

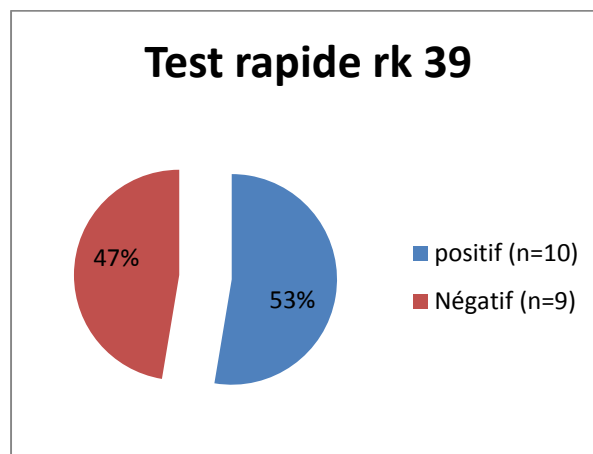


Figure 19 : Répartition des patients en fonction des résultats du test rapide.

5-Diagnostics retenus

Au terme de notre étude nous avons retenu 10 cas de leishmaniose viscérale.

Les patients ne présentant pas une leishmaniose viscérale ont bénéficié d'investigations supplémentaires à visée étiologique. Les étiologies retrouvées sont illustrées dans le tableau suivant :

Tableau 1 : Répartition des cas selon le diagnostic retenu

Diagnostic retenu	Nombre de patients
Leishmaniose viscérale	N=8
Leucémie aigue lymphoblastique	N=1
Lymphome de Hodgkin	N=1
Erythroblastopénie	N=1
Fièvre typhoïde	N=1
Aplasie médullaire	N=1
Maladie de Gaucher	N=1
Syndrome d'activation macrophagique	N=1
Maladie de caroli	N=1

6-Traitement et Evolution

Tous les patients dont le diagnostic de leishmaniose viscérale a été confirmé, ont bénéficié d'un traitement de première intention à base d'antimoniote de méglumine (GLUCANTIME®) sauf une patiente qui est décédée précocement avant d'instaurer le traitement à cause d'une pneumopathie sévère ne répondant pas à une antibiothérapie large spectre et aux mesures de réanimation.

Deux de nos patients présentent une résistance au Glucantime®, un traitement par l'amphotéricine B (Fungizone®) est indiqué mais vue la non disponibilité de ce dernier au Maroc, nos patients ont reçu des cures de Glucantime® au cours de leurs hospitalisations, Une demande est faite auprès de la pharmacie de l'hôpital pour un approvisionnement de la Fungizone®.

Le diagramme suivant illustre l'évolution des patients porteurs d'une leishmaniose viscérale :

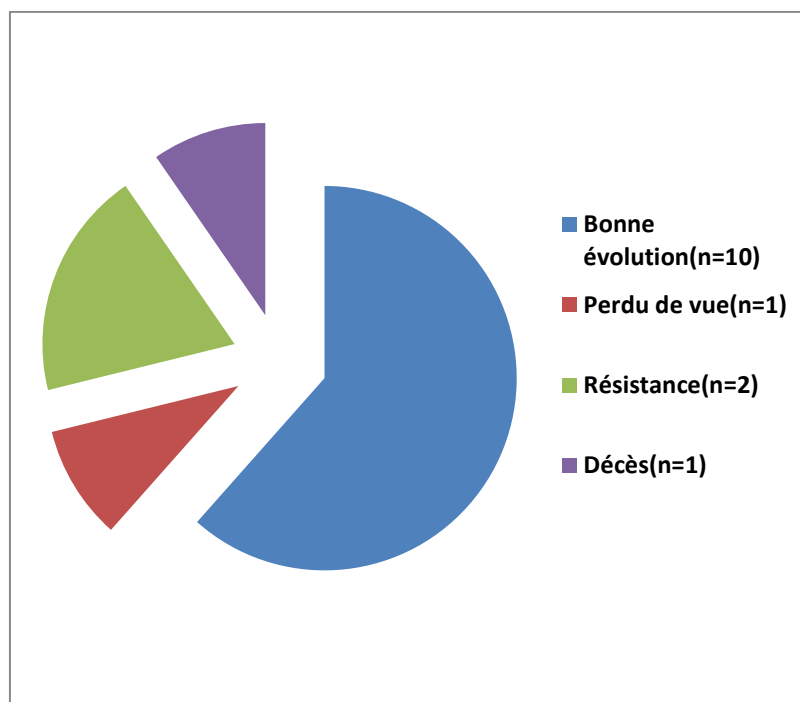


Figure 20: Répartition des patients présentant une leishmaniose viscérale selon leur évolution.

B-Résultats analytiques :

B-1- Caractéristiques statistiques des méthodes diagnostiques utilisées dans notre série :

1-Définitions

Pour évaluer la fiabilité du test rapide rk 39, il est impératif de mesurer sa validité intrinsèque (sa sensibilité et sa spécificité), raison pour laquelle nous avons comparé les résultats de notre test à ceux des autres méthodes diagnostiques utilisées chez nos patients. Ainsi nous avons obtenu les variables suivantes :

- Vrais positifs (VP) : positif au test rapide et aux autres moyens.
- Faux positifs (FP) : positifs uniquement au test rapide.
- Vrais négatifs : négatifs au test rapide et aux autres tests.
- Faux négatifs : négatifs uniquement au test rapide.

A partir de ces variables nous pouvons calculer certaines caractéristiques du test rapide tel que la sensibilité, la spécificité, les valeurs prédictives (positive et négative).

Sensibilité (Se) : Capacité du test rapide rk 39 à pouvoir détecter les sujets atteints de leishmaniose viscérale dans notre population d'étude. Elle mesure ainsi l'aptitude du test à éliminer les faux négatifs (FN).

Formule : $Se (\%) = VP \times 100 / VP + FN$

Spécificité (Sp): Capacité du test rapide rk 39 à détecter des sujets indemnes de leishmaniose viscérale dans notre population d'étude. Elle mesure ainsi l'aptitude du test à éliminer les faux positifs (FP).

Formule : $Sp (\%) = VN \times 100 / FP + VN$

Valeur prédictive positive (VPP) : Elle correspond à la probabilité qu'un sujet soit réellement malade lorsque le test est positif.

Formule : $VPP (\%) = VP \times 100 / VP + FP$

La valeur prédictive négative (VPN): Elle correspond à la probabilité qu'un sujet soit vraiment non-malade quand le test est négatif.

Formule : $VPN (\%) = VN \times 100 / (VN + FN)$

2-Résultats obtenus chez nos patients :

Résultats du test rapide rk 39

Le test rapide rk 39 est revenu positif chez 10 patients présentant la leishmaniose viscérale, alors qu'il est négatif chez un patient ayant une leishmaniose viscérale. Il est négatif chez tous les patients ne présentant pas une leishmaniose viscérale. En autre terme, il y a un faux négatif et aucun faux positif.

La sensibilité est calculée à 90.9% et la spécificité à 100%.

Tableau 2 : Résultats du test rapide rk 39

	Leishmaniose viscérale(+)	Leishmaniose viscérale (-)
Test rapide rk 39 positif	10	0
Test rapide rk 39 négatif	1	8

Résultats de l'examen microscopique direct :

L'examen microscopique direct a montré les corps de leishmanies sur toutes les lames des patients ayant une leishmaniose viscérale, mais nous avons constaté que le nombre des corps de leishmanies varie d'un frottis à un autre, à cause de la subjectivité du test et /ou la qualité de l'étalement des lames. Nous n'avons objectivé aucun corps de leishmanie chez les patients n'ayant pas une leishmaniose viscérale. Donc aucun faux positif ni faux négatif. Par conséquent une sensibilité et une spécificité à 100%.

Tableau 3 : Résultats de l'examen microscopique direct

	Leishmaniose viscérale(+)	Leishmaniose viscérale (-)
Examen direct positif	11	0
Examen direct négatif	0	8

Résultats de la PCR

Vue sa haute sensibilité et bonne spécificité, la PCR est considérée dans notre étude comme examen de référence, aucun faux positif ni faux négatif n'a été noté avec cette méthode, et donc une sensibilité et une spécificité à 100%.

Elle a permis d'identifier l'espèce **Leishmania Infantum** chez tous les patients ayant une leishmaniose viscérale.

Tableau 4 : Résultats de la PCR

	Leishmaniose viscérale(+)	Leishmaniose viscérale (-)
PCR positive	11	0
PCR négative	0	8

Résultats de l'examen sérologique ELISA :

L'ELISA a permis de confirmer 8 cas de leishmaniose, alors que les résultats est douteux pour 3 patients, à noter que nous avons considéré les cas douteux comme non concluants et donc négatifs, cependant elle est revenue négative chez tous les patients ne présentant pas une leishmaniose viscérale. En conclusion 3 faux négatifs, sans faux positif.

D'après ces résultats, la sensibilité est à 72.7% et la spécificité à 100%.

Tableau 5 : Résultats de l'examen sérologique ELISA

	Leishmaniose viscérale(+)	Leishmaniose viscérale (-)
ELISA positive	8	0
ELISA négative	3	8

B-2-Concordance entre les différentes méthodes diagnostiques:

La sensibilité du test rapide rk 39 (90.9%) est inférieure à celle de l'examen direct et de la PCR (100%), par contre elle est supérieure à celle de l'ELISA (72.7%). La spécificité du test rapide est similaire à celle des autres méthodes. Le tableau suivant montre, de façon comparative, les caractéristiques statistiques des différents examens :

Tableau 6 : Les différentes caractéristiques statistiques des tests diagnostiques utilisés chez nos patients

	sensibilité	Spécificité	VPP	VPN
Test rk 39	90.9%	100%	100%	88.8%
Examen direct	100%	100%	100%	100%
PCR	100%	100%	100%	100%
ELISA	72,7%	100%	100%	72,7%

DISCUSSSION

A-Présentation générale des tests rapides

1-Définition :

Les tests de diagnostic rapide (TDR) sont des dispositifs médicaux de diagnostic in vitro (DMDIV) considérés comme des tests analytiques : ils ne représentent pas un type d'examen en particulier mais plutôt un ensemble de situations analytiques répondant à certaines conditions essentielles, différentes selon les pays. Les critères, décrits par le Collège of American Pathologists relèvent d'une réalisation rapide au sein et en dehors du laboratoire, d'une obtention précoce des résultats, et d'une utilisation simple sans interférence sur la qualité du résultat [14].

2-Caractéristiques générales des tests de diagnostic rapide

Rapidité

Les trois phases analytiques sont réduites. La durée de la première qui est pré-analytique et qui résulte du prélèvement de l'échantillon sur le patient, est particulièrement diminuée puisque l'on évite tout transport vers le laboratoire. La seconde, analytique, est réalisée sans intervention particulière sur l'échantillon. Enfin, la phase d'interprétation ou post-analytique, est aisée. En effet, la lecture des résultats est également aisée ainsi que la transmission de l'information au clinicien. Le temps entre la prescription du test par le médecin et le rendu des résultats est ainsi diminué. La décision thérapeutique peut alors être prise plus rapidement ce qui devrait améliorer le pronostic et entraîner une réduction du coût correspondant à une hospitalisation prolongée [15], [16].

Simplicité

Consistant seulement à déposer un prélèvement de qualité sur la zone d'absorption, le test en lui-même est très simple pour l'opérateur. Sa lecture

est également facile ce qui le rend accessible à différents professionnels de santé.

Délocalisation des tests

Les tests rapides peuvent être effectués hors du laboratoire d'analyse et sans contrôle d'un biologiste. Cette délocalisation apporte plusieurs grands avantages. Les tests rapides permettent donc un gain de temps et à un gain économique que ce soit hospitalier ou analytique.

Limites des tests rapides

Les limites des tests sont à connaître par l'opérateur afin qu'ils puissent pondérer les résultats et en tirer une meilleure interprétation. Celles-ci peuvent relever d'éléments environnementaux tels que la qualité du prélèvement de l'échantillon qui doit s'effectuer dans des conditions optimales et par un personnel formé. Par ailleurs, les limites peuvent être dues à des circonstances ou des éléments intrinsèques aux tests. Des réactions croisées ou des interactions avec les réactifs sont à prévoir et à analyser puisqu'elles sont responsables de faux positifs ou faux négatifs. Enfin, l'interprétation est primordiale dans ces tests et devra être effectuée par des opérateurs formés [14].

3- Caractéristiques techniques des tests rapides

Les tests rapides reposent essentiellement sur des techniques immunologiques, c'est-à-dire des réactions entre des anticorps et des antigènes. Les autres tests sont basés sur des principes biochimiques ou enzymatiques. Ils existent plusieurs techniques, mais nous allons aborder uniquement la méthode immunochromatographique qui est utilisée dans le test rapide rk 39.

3-1-Principe de fonctionnement :

Cette technique repose sur une révélation immunologique grâce à une migration par capillarité d'anticorps ou de complexes immuns et se présente sous forme de bandelette ou de cassette [14]. Une combinaison d'immunoglobulines humaines ou animales (anticorps de chèvre anti-souris) est fixée et concentrée en bandes à différents endroits d'une membrane la plupart du temps en nitrocellulose. L'échantillon contenant ou non l'antigène recherché est déposé dans le pad échantillon. Cet élément filtre les molécules de l'échantillon laissant diffuser l'antigène recherché. Localisé sous ce dernier se situe le pad conjugué qui contient des anticorps de souris dirigés contre l'antigène recherché qui sont conjugués, en général, à de l'or colloïdal. Enfin, le pad absorbant permet la migration de ces complexes immuns. En outre, un échantillon déposé sur la zone d'absorption migre au travers de cette membrane et les antigènes de celui-ci sont captés par ces anticorps ce qui entraîne une coloration de la zone (figure). Cette migration capillaire peut s'effectuer transversalement (immunofiltration) ou latéralement [14].

L'apparition colorée de la zone de contrôle doit être systématique : elle traduit et affirme la bonne migration du flux. En présence de l'antigène à détecter, une deuxième zone se colore : le test est alors positif. Enfin, si la molécule à détecter est l'antigène, la technique est directe et si la détection met en évidence un anticorps, la technique est indirecte. La seconde bande dite « bande de contrôle » est un contrôle interne du test. Elle doit impérativement et systématiquement apparaître affirmant la bonne migration du flux [14].

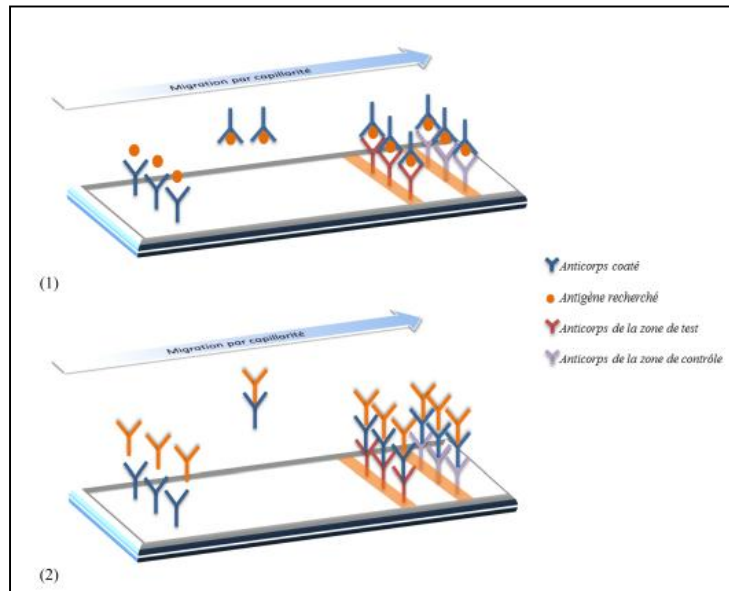


Figure 21 : Décomposition de la positivité de tests immunochromatographiques direct (1) et indirect (2) [17].

3-2-Caractéristiques internes [17] [18]

Un examen diagnostique en général doit être évalué avant d'en envisager l'utilisation pratique. Un jugement est ainsi porté sur ses capacités à remplir ses objectifs, par rapport à une situation de référence pour pouvoir étayer une hypothèse diagnostique d'une manière fiable et pertinente. Les paramètres utilisés dans le cadre de tous les tests de diagnostic sont la sensibilité (Se), la spécificité (Sp), les seuils de détection, les valeurs prédictives positives (VPP) et négatives (VPN).

a- Sensibilité

La sensibilité d'un test est déterminée sur une population de patients dont la maladie M a été diagnostiquée par un test de référence. Statistiquement, elle est reliée à la proportion de patients malades diagnostiqués présentant cette maladie M (vrais positifs) et à la proportion de patients malades que le test n'a pas identifiés (faux négatifs). Ainsi, elle est obtenue par division de vrais positifs obtenus par un gold standard par le nombre de personnes malades.

Théoriquement cette sensibilité devrait être de 100 %, c'est-à-dire que tous les malades ont un test positif. En pratique, plus elle tend vers 100 %, moins il y a de faux négatifs et meilleur est le test [18].

b- Spécificité

La spécificité est la probabilité que le test soit négatif parmi les sujets non malades, c'est-à-dire la proportion de personnes saines ayant un test négatif. Elle est obtenue en divisant le nombre de personnes saines ayant un test négatif (VN) par le nombre de personnes saines (VN + VP). La spécificité détermine donc la capacité d'un test à ne détecter qu'un seul type de maladie ou de molécule recherchée. Comme la sensibilité elle devrait théoriquement être de 100 %. En pratique, plus elle tend de 100 %, moins il existe de faux positifs et meilleur est le test [18].

c-Valeurs prédictives

La sensibilité et la spécificité d'un test permettent de définir des caractéristiques intrinsèques au test mais sont peu dépendantes de la prévalence de la pathologie. Elles ne permettent pas de prédire si une personne est réellement malade en cas de positivité du test. Ce sont les valeurs prédictives qui le permettent. Ainsi, la valeur prédictive positive (VPP) représente la probabilité de présenter une maladie en cas de positivité d'un test. Elle est donnée par le rapport des vrais positifs sur l'ensemble des tests positifs. Cette valeur est la probabilité a posteriori d'avoir la maladie recherchée si le test est positif. Plus cette valeur tend vers 100 %, plus le nombre de faux positifs est faible. De la même manière, la valeur prédictive négative est la probabilité de ne pas être malade sachant que le test est négatif, c'est-à-dire la proportion de personnes réellement saines présentant un test négatif. Elle est obtenue par le rapport du nombre de personnes saines ayant un test négatif sur le nombre de personnes ayant

un test négatif. Plus cette valeur tend vers 100 %, plus le nombre de faux négatif est faible [18].

En bref, plus la prévalence d'une maladie est forte, plus la valeur prédictive positive est proche de 100 % et la valeur prédictive négative de 0 %. Meilleure est la sensibilité du test et meilleure sera la VPN ; de même, meilleure est la spécificité et meilleure sera la VPP [18].

d- Seuil de détection

Les tests qualitatifs déterminent si la molécule est présente ou non en fonction d'un seuil anormal de détection. Quant à eux, les tests quantitatifs définissent le seuil à partir duquel le test peut être considéré comme positif. La figure (23) représente la répartition d'un paramètre dans une population saine et dans une population malade. Certaines personnes saines ont des taux plus élevés que des personnes malades. Le choix du seuil tient compte de cette population. Ainsi, si le seuil est trop élevé, seules les personnes malades peuvent avoir un tel taux, minimisant les faux positifs, mais maximisant les faux négatifs. Inversement s'il est très faible, beaucoup de personnes saines sont considérées comme malades, maximisant les faux positifs, et minimisant les faux négatifs. Cela revient à dire qu'un seuil élevé favorise la spécificité (absence de faux-positif) et qu'un seuil faible favorise la sensibilité (aucun faux négatif) [18].

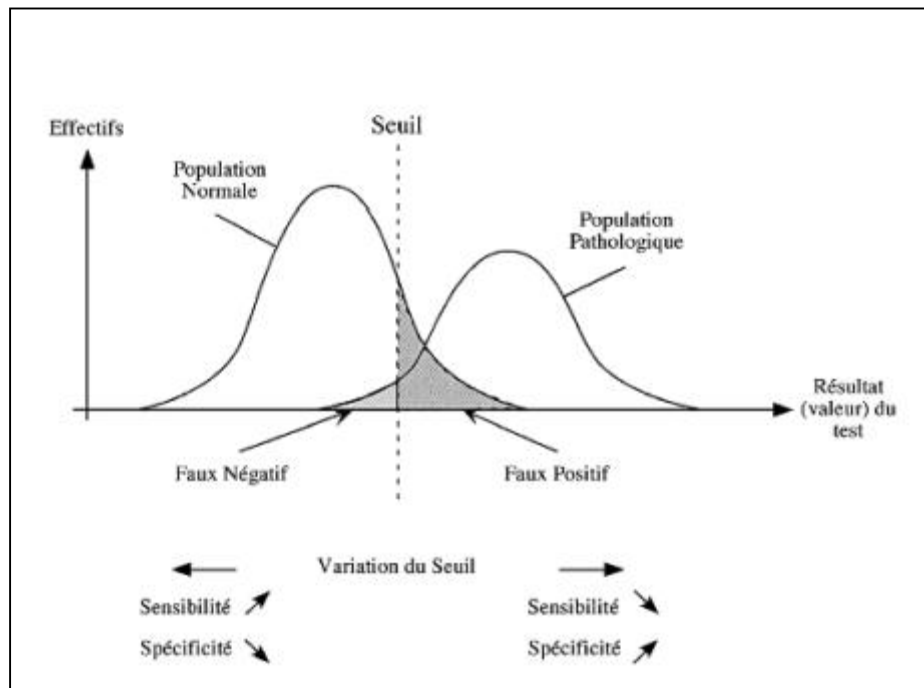


Figure 22: Répartition des populations dans le cadre des tests quantitatifs [18].

B-Méthodes de diagnostic de la leishmaniose viscérale :

Avantage et inconvénients.

1-Examen direct et culture :

L'examen parasitologique direct sert à visualiser les corps de leishmanie sur le frottis, c'est un examen doté d'une haute spécificité avec une sensibilité optimale allant de 93,1 à 98,7% pour la ponction splénique, de 52-85% pour les prélèvements de la moelle osseuse et de 52-58% pour la ponction ganglionnaire.[33]

La culture permet de rendre plus sensible le diagnostic parasitologique, d'identifier précisément le parasite (profil iso-enzymatique, phénotype, génotype) et de tester la sensibilité des souches aux leishmanicides. Différents milieux de culture sont utilisés, surtout le classique milieu NNN (milieu de Novy Mc Neal Nicolle). L'incubation se fait à des températures précises (21°C à 27°C) la croissance du parasite est lente, les promastigotes sont détectés entre une à

quatre semaines après l'ensemencement. Une culture n'est déclarée négative qu'après quatre à cinq semaines [6].

L'examen microscopique direct et la culture possèdent plusieurs avantages mais aussi des inconvénients [6]

- **Avantages** : l'adénogramme est facile à réaliser et à lire, le myélogramme est plus sensible ; Il peut confirmer le processus infectieux (parasite abondant, infiltration lymphoplasmocytaire), et éliminer d'autres processus pathologiques (lymphome, leucémie, maladie de surcharge). La culture et l'inoculation permettent de typer la souche.
- **Inconvénients** : le myélogramme est de réalisation délicate ; sa sensibilité est parfois insuffisante et la lecture difficile, nécessitant alors une expertise confirmée ou le recours à un autre examen (immunomarquage par exemple). Il ne fournit pas d'indication pronostique. La mise en culture nécessite une incubation qui peut arriver jusqu'à plusieurs semaines.

Le tableau suivant montre la sensibilité de l'examen direct dans notre série ainsi que dans quelques séries maghrébines [1] [4] [19] [20] [21] :

Série	BESBES [19]	THIMOU [20]	ELOAURDI [21]	IDRISSI [1]	TAMIMI [4]	Notre série
Examen direct (sensibilité)	89%	82.5%	100%	87.9%	98,6%	100%

2-La PCR : [22] [6]

Quand il est disponible, le diagnostic moléculaire est un excellent outil du diagnostic et du suivi des leishmanioses. La PCR détecte des parasitémies inférieures à un parasite par microlitre [15]. La sensibilité de cette technique dans un prélèvement médullaire approche 100 % [38]. La sensibilité est similaire sur prélèvements sanguins [35]. La spécificité est excellente.

Plusieurs auteurs rapportent sa spécificité dans le diagnostic d'une résistance ou d'une rechute, d'autant plus qu'elle peut être pratiquée sur un sang périphérique, évitant donc la répétition des médullogrammes. Elle est très intéressante même en cas de faible densité parasitaire. Le développement des techniques de biologie moléculaire associé à une meilleure connaissance du génome des leishmanies a permis la mise au point de techniques de typage moléculaire autorisant un typage fin de chaque souche. Le développement et la diffusion de ces techniques permettront de parfaire notre connaissance des leishmanioses[22]. La PCR permet de confirmer l'espèce mais également de retrouver le lieu de contamination notamment en cas de séjours multiples en zone d'endémie [23].

Par ailleurs, les techniques moléculaires, particulièrement la PCR, restent coûteuses et réservées à des laboratoires spécialisées. De plus, leur extrême sensibilité rend parfois délicate un portage asymptomatique, courant en zone d'endémie. [23]

La PCR a également été tentée sur les urines dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale méditerranéenne chez des patients sidéens. La sensibilité observée était de 88%, et ce type de prélèvement a même pu être utilisé pour le suivi.[38]

Dans notre série, la PCR réalisée sur prélèvement médullaire a montré une sensibilité et une spécificité à 100%, elle a permis l'identification de l'espèce *leishmania infantum* chez les 8 patients atteints d'une leishmaniose viscérale.

3-Épreuves sérologiques [6] [33]

Plusieurs épreuves sérologiques sont maintenant utilisées pour détecter les anticorps anti-*leishmania*. Elles sont appliquées seulement aux individus immunocompétents.

Le diagnostic sérologique est aujourd'hui essentiellement basé sur les tests ELISA. Les performances de ces tests dépendent bien entendu de l'antigène utilisé. Celui qui semble donner les meilleurs résultats est l'antigène recombinant Rk39 (recombinant kinesin 39). Les titres d'anticorps contre cet antigène sont bien corrélés à une maladie évolutive et restent utiles chez le patient sidéen, où ils permettent même de prédire les rechutes cliniques.

Bien que l'IFI présente une excellente sensibilité et spécificité, elle présente l'inconvénient de sa lourdeur, de la subjectivité de la lecture et globalement, d'un manque de standardisation.

Le western blot est utilisé en diagnostic courant comme technique de confirmation, avec deux bandes à 14- et 16/18-kDa spécifiques de *Leishmania infantum*. Il est beaucoup plus sensible et plus spécifique que les autres tests, mais son coût prohibitif et son interprétation parfois délicate le font réserver à des cas particuliers. Il a également été utilisé pour détecter les porteurs sains à *L. infantum*.

Le Test d'Agglutination Directe (DAT) est un test simple et relativement peu coûteux, d'une grande sensibilité (autour de 95%). Il est extrêmement utilisé en zone d'endémie, et souvent considéré comme le test de référence. Sa

réputation souffre d'une spécificité moyenne, mais elle semble en fait élevée. Il peut également détecter porteurs sains (qui sont alors perçus comme faux positifs).

Dans notre série, nous avons utilisé la méthode sérologique ELISA, elle a révélé une sensibilité à 70% et une spécificité à 100%.

4-Épreuve d'hypersensibilité retardée [6]

L'hypersensibilité retardée est une caractéristique importante de toutes les leishmanioses humaines et peut être mesurée par le test à la leishmanine, aussi connue comme la réaction de Monténégro (27). La leishmanine est une suspension tuée de promastigotes entiers ($0,5-1 \times 10^7/\text{ml}$) ou détruits (250 μg de protéine/ml) dans une solution saline sans pyrogène contenant du phénol. Une réaction retardée se développe et est lue 48 à 72 h plus tard.

Le taux de réaction faussement positive chez des personnes saines est approximativement de 1 %, mais Il peut être plus élevé dans les régions où existe un contexte de leishmaniose, car dans ce cas, beaucoup de populations saines peuvent présenter un taux de sensibilité assez élevé à la leishmanine. Bien que la réactivité croisée entre toutes les souches de *Leishmania* soit complète, les antigènes hétérologues donnent souvent des réactions plus petites, et cela peut être la cause de difficulté dans la normalisation. Le test à la leishmanine est utilisé dans le diagnostic clinique de la leishmaniose cutanée. Dans la leishmaniose viscérale, elle mesure seulement des infections passées car une anergie complète est observée au cours de la maladie active. Les leishmanines ne sont plus disponibles commercialement.

C-Test rapide rk 39 pour le diagnostic de leishmaniose viscérale :

1-Méthodologie :

Le test rapide rk 39 est une méthode sérologique, immunochromatographique instaurée pour permettre un diagnostic rapide de la leishmaniose viscérale. Elle consiste à détecter les anticorps circulants dirigés contre l'AG rk 39 du genre *Leishmania donovani*.

Il n'est pas évident qu'un TDR évalué et validé ailleurs garde sa validité diagnostique dans notre contexte. Il faut être sûr de ses performances sur le terrain, et donc il faut l'évaluer. Notre étude, ayant pour but l'évaluation de la performance du test rapide rk 39, est la première réalisée au Maroc. Elle est menée en collaboration entre l'institut national d'hygiène de Rabat et le service de pédiatrie CHU Hassan II de Fès, elle fait néanmoins suite à plusieurs études effectuées dans des zones d'endémicité en Inde, Brésil et Afrique de l'Est.

Nous rapportons les résultats préliminaires d'une étude toujours en cours, nous avons pu colliger 19 prélèvements sur une période de 12 mois. Les contraintes que nous avons rencontrées étaient essentiellement liées à l'acheminement des échantillons à l'INH qui devait se faire à l'état frais (le jour même du prélèvement sanguin et médullaire).

2-Performances du test rapide rk 39:

Les résultats obtenus par le test rapide rk 39 chez nos patients ont été comparés avec ceux de l'examen direct, la PCR, et l'ELISA. Au terme de cette comparaison, le test rapide rk 39 a révélé une sensibilité à 90.9% et une spécificité à 100%.

a- La sensibilité :

La **Sensibilité** du test rapide rk 39 a été calculée à 90.9%. Cette valeur indique que dans la pratique sur 100 cas de leishmaniose viscérale positive, le test rapide rk 39 sera capable d'en confirmer environs 91. En d'autres termes il ne sera pas capable de confirmer 9 cas positifs. D'où les 9 faux négatifs obtenus sur les 100 positifs. Cette sensibilité est inférieure à celles trouvées en suisse par P. Marty et all [38], en Bangladech par M.Gulam et all[30], et en Inde par S.Sunday [39], qui étaient respectivement de 97% et 95%, et de 100%. Elle avoisine celle obtenue après l'étude de Koert et all en sudan [32] (**Dia Med-IT leish**) qui est de 90% avec l'Ag rk 39 **IT-leish®**. Par contre elle est supérieure à celle trouvée en France du sud par le **Distpik test**, et celle obtenue en Brésil [25] qui sont respectivement de l'ordre de 81.8% (étude rk 39) et 85.7%.

b-La spécificité :

La **spécificité** du test rapide rk39 **IT-Leish®** a été chiffrée dans la présente étude à 100%. Ce qui signifie en d'autres termes que sur 100 sujets réellement négatifs, le test rapide rk39 **IT-Leish®** a été capable de confirmer tous les sujets sans faux positifs. Une étude brésilienne menée par Félix Javier et all [25], a utilisé le test rapide rk 39 chez 272 patients ayant une leishmaniose cutanée confirmée par PCR, le résultat chez les 272 patients est revenu négatif témoignant de l'absence de réactions croisées avec l'espèce leishmania braziliensis et donc une spécificité de 100% du test rapide rk 39, ces résultats rejoignent ceux retrouvés en Iran, en Italy et en Inde [24]. La spécificité du test rapide rk 39 retrouvée au Soudan et en Inde est respectivement de 99% et 95% [29].

c-Résultats du test rapide rk 39 dans les urines :

Dans une étude indienne menée par Singh D et al en 2012 [37], le test rapide rk 39 a été réalisé dans le sang et dans les urines chez 786 patients (365 confirmés VL et 421 sujets témoins). La sensibilité du test dans le sérum était de 100%, alors que la spécificité était de 93,8%, et 100%, et 96,2% respectivement chez les témoins sains provenant d'une zone d'endémie, des témoins de zone non endémique et de sujets atteints d'une autre maladie infectieuse. Cependant, dans des échantillons d'urine, la sensibilité est de 96,1% et la spécificité de 100%. Les auteurs ont conclu à la possibilité de la réalisation du test rapide sur un échantillon urinaire, permettant un diagnostic rapide et moins invasif que le prélèvement sanguin.

d-L'antigène rk 39:

L'antigène le plus utilisé dans le test chromatographique rapide pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale est l'Ag rk 39. Il s'agit d'un antigène recombinant de 39 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine de kinésine de *Leishmania* majeure en Inde.

Néanmoins, deux autres antigènes ont été évalués pour le diagnostic rapide, à savoir le rk-26 et le rk E16, plusieurs études ont comparés la fiabilité de ces Ag par rapport à celle de l'Ag rk 39.

Une étude menée par S.Sundar en Inde [40] à propos de 452 prélèvements (230 cas de leishmaniose confirmée, 100 contrôles de personnes saines provenant d'une zone d'endémie, 52 cas suspects, et 70 sains). Les auteurs ont comparé les résultats de l'examen microscopique direct à ceux des tests sérologiques : test d'agglutination directe (DAT), et les tests chromatographiques rapides en utilisant l'Ag rK-39, et l'Ag rK-26. Le test rk 39 a révélé une sensibilité à 100%, avec une

spécificité à 97%. Alors que le test rk26 a révélé une sensibilité à 22,6%, et une spécificité à 100%.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) [36] a récemment publié une étude exhaustive qui a évalué les tests rapides pour la leishmaniose viscérale dans trois régions endémiques: le sous-continent indien, Afrique de l'Est et au Brésil (Figure 24). Les antigènes utilisés dans cette étude sont le rK39 et rKE16. Dans ces trois régions, les tests rapides présentent des spécificités qui ont dépassé les 95% pour les deux antigènes. Les deux antigènes présentaient une sensibilité élevée (plus de 93%) dans le sous-continent indien. En Afrique et au Brésil, les sensibilités de l'antigène rK39 étaient de 77,4% et 88,4%, respectivement. Dans les deux régions, les sensibilités de l'antigène rKE16 étaient très faibles, allant de 36,8 à 79,2% (OMS 2011). La faible sensibilité du test rKE16 en Afrique et au Brésil peut-être dû à l'utilisation d'un antigène rKE16 recombinant qui a été dérivée d'une souche de *Leishmania donovani* de l'Inde.

La variabilité de la sensibilité des tests rapides pour VL dans les différentes régions du monde pourrait être le résultat de la diversité des souches parasitaires et des taux d'anticorps sériques, qui sont étroitement liés à des facteurs génétiques individuels, immunologiques, nutritionnels et environnementaux. [36]

		East Africa		Brazil		Indian subcontinent	
Product	Manufacturer	Sensitivity (95% CI) n=250	Specificity (95% CI) n=250	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	Sensitivity (95% CI) n=250	Specificity (95% CI) n=249
Crystal [®] KA	Span Diagnostics Ltd.	36.8% (31.1-42.9%)	98.0% (95.4-99.1%)	61.5% (55.2-67.4%) ^a	98.4% (95.9-99.4%) ^b	92.8% (88.9-95.4%)	99.2% (97.1-99.8%)
DiaMed-IT LEISH	Bio-Rad Laboratories	87.2% (82.5-90.8%)	96.4% (93.3-98.1%)	92.0% (87.8-94.8%) ^c	95.6% (92.2-97.5%) ^d	98.8% (96.5-99.6%)	97.6% (94.8-98.9%)
Kalazar Detect [™]	InBios International, Inc.	67.6% (61.6-73.1%)	90.8% (86.6-93.8%)	84.7% (79.7-88.7%) ^e	96.8% (93.9-98.4%) ^f	99.6% (97.8-99.9%)	96.0% (92.8-97.8%)
Signal [®] – KA	Span Diagnostics Ltd.	73.2% (67.4-78.3%)	96.4% (93.3-98.1%)	79.2% (73.7-83.8%) ^g	98.8% (96.6-99.6%) ^h	100% (97.9-100%) ⁱ	100% (97.8-100%) ^j
Onsite Leishmania Ab Rapid	CTK Biotech. Inc.	na	na	na	na	99.6% (97.8-99.9%)	96.8% (93.8-98.4%)

Figure 23 : résultats de la méta-analyse menée par l'OMS évaluant le test rapide avec différents antigènes dans 3 continents[36].

Product Name	Manufacturer	Catalogue Number	Bound Antigen
DiaMed-IT LEISH	Bio-Rad Laboratories	46240	rK39
Crystal®KA	Span Diagnostics Ltd.	56IC102-25 ^a	rKE16
Signal®-KA ^b	Span Diagnostics Ltd.	56FT100-050 ^a	rKE16
Kalazar Detect™	InBios International Inc.	INS025	rK39
Onsite Leishmania Ab Rapid Test ^c	CTK Biotech, Inc.	R01225	rK39

Figure 24: les Antigènes utilisés dans la méta-analyse menée par l'OMS[36]

3-Limites du test rapide rk 39 [36]:

Le test rapide rk 39 est une méthode sérologique basée sur la détection des anticorps, Par conséquent il ne doit être utilisé que chez les patients immunocompétents. Il ne doit pas être utilisé en cas de suspicion de rechute d'une leishmaniose viscérale à cause de la persistance des anticorps détectés par l'Ag rK 39 plus de 24 mois après succès thérapeutique [38] [41]

Devant un test rk 39 négatif contrastant avec des signes cliniques et biologiques en faveur d'une leishmaniose viscérale, un autre examen de certitude doit être demandé pour confirmer ou affirmer le diagnostic.

Le test rk 39 est évalué pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale causée par l'espèce **Leishmania infantum**, et par conséquent, dans les régions où un autre genre domine, le test rk 39 sera moins fiable.

CONCLUSION

Au Maroc, la leishmaniose viscérale est un problème de santé publique. La région de Fès constitue un foyer endémique. Cela est relié à la prépondérance du réservoir canin (le chien) et l'absence d'un vaccin.

L'OMS a établie une stratégie de lutte contre la leishmaniose, celle-ci est basée sur le diagnostic précoce et le traitement rapide; la lutte contre les Hôtes réservoirs et les vecteurs **Phlebotomus**.

Le diagnostic positif, jusqu'à l'heure actuelle, repose sur des méthodes couteuses et/ou invasives, qui nécessitent un personnel qualifié et un matériel spécialisé disponible uniquement dans les grandes villes. En outre, Les sujets atteints de la LV habitent généralement, des régions lointaines, démunies et difficilement accessibles, par conséquent ils ne bénéficient pas du diagnostic biologique et ils sont pris en charge tardivement.

Le test rapide rk 39 est une innovation importante en matière du diagnostic de leishmaniose viscérale car il permet un diagnostic rapide, simple, et peu couteux.

Les résultats préliminaires de notre étude prospective, qui est en cours, malgré son faible effectif, suggèrent que le test rapide rk 39 permet d'apporter un plus dans le diagnostic précoce de la leishmaniose viscérale.

Nous espérons continuer cette étude, ce qui permettra de recruter un nombre suffisant de patients, afin de consolider les résultats obtenus et valider le test rk 39 pour une utilisation plus large surtout dans les zones démunies et lointaines.

RESUME

La leishmaniose viscérale (LV) est une parasitose due à la multiplication d'un protozoaire flagellé du genre *Leishmania*. Elle se manifeste par une fièvre anarchoïque associée à une énorme splénomégalie. Le diagnostic de confirmation repose sur l'examen microscopique direct, la PCR, et la sérologie. Un nouveau test sérologique rapide détectant des anticorps dirigés contre l'antigène rk 39, a été évalué dans différentes situations d'endémicité de LV.

L'objectif de notre travail est de déterminer sa sensibilité et sa spécificité.

Nous avons mené une étude prospective continue entamée depuis le mois de Février 2015, incluant les patients hospitalisés au service de pédiatrie CHU Hassan II Fès, pour suspicion de leishmaniose viscérale.

Les prélèvements sanguins et médullaires de nos patients ont été traités à l'institut national d'hygiène de Rabat.

Au total, nous avons réalisé 19 prélèvements chez 16 patients, 9 filles et 7 garçons

10 de nos patients proviennent de la région Fès– Boulmane et Taounate.

L'âge moyen de nos patients est de 3.2 ans. Sur le plan clinique, la fièvre est retrouvée chez tous les patients, la pâleur cutanéomuqueuse chez 14 patients, et la splénomégalie chez 12 patients.

Sur le plan hématologique, la pancytopénie est retrouvée chez 12 patients, le syndrome inflammatoire biologique est présent chez 11 patients. Les résultats comparatifs des différentes méthodes diagnostiques ont objectivé que la sensibilité du test rapide rk39 (90.9%) est inférieure à celle de l'examen direct et la PCR (100%) ; alors qu'elle est supérieure à celle de la méthode sérologique ELISA (72.7%) ; par contre sa spécificité (100%) est similaire à celle des autres tests diagnostiques.

Le test de diagnostic rapide rk39 pour la leishmaniose viscérale (LV) est parmi les plus importantes innovations. La bonne sensibilité et spécificité de ce test a été prouvée dans plusieurs séries.

Nous avons donné à travers cette série limitée des résultats préliminaires, pour tirer des conclusions, des études supplémentaires avec un échantillon représentatif sont indispensables.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] M. LAKHDAR IDRISSE , M. EL OUARDI, S. ATMANI, L. ELARQAM, A. BOUHARROU, M. HIDA. La leishmaniose viscérale infantile: à propos de 209 cas. Journal de pédiatrie et de puériculture 2007 ; 20 : 136 – 141.
- [2] L. ZOUGAGHI, R. MOUTAJ. Leishmaniose viscérale infantile : profil épidémiologique, clinique biologique. À propos de 93 cas. Archives de pédiatrie 2009 ; 16(11) : 1513–18.
- [3] S. SAFI, Z. TAZI. La Leishmaniose viscérale de l'adulte, étude de 7 observations. Médecine du Maghreb 1996 ; 59 : 17–22.
- [4] H.TAMIMY. La leishmaniose viscérale infantile (A propos de 73 cas). Thèse de médecine, Faculté de médecine et de pharmacie de Fès 2011.
- [5] O.IBRAHIM. La leishmaniose viscérale et atypique de l'enfant (A propos de 80 cas). Thèse de médecine, Faculté de médecine et de pharmacie de Fès 2012.
- [6] M. BEN GHAZI., La leishmaniose viscérale de l'adulte :Etude de 18 observations en médecine interne.Thèse de médecine Faculté de médecine et de pharmacie de Fès 2010.
- [7] Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies (D.E.L.M) : Maroc en chiffre, 2006.
- [8] D.SACKS, ET S.KAMHAWI. Molecular aspects of parasite–vector and vector–host interactions in Leishmaniasis. Annu. Rev. Microbiol 2001; 55 : 453–83.
- [9] P.MINODIER, R.PIAROUX, J.GARNIER. Leishmaniose viscérale méditerranéenne : physiopathologie. Presse médicale 1999 ; 28 (1) : 33–39.
- [10] S.SAHA, S.MONDAL. Immune responses in Kala-azar. Indian.J.Med.Res.March 2006 ;123 : 245–266.
- [11] A.SUZANNE, S.CONRAD.S,R. ALVES, S. JERONIMO et G.MOSSER.R. A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen leishmania. J.E.M. March 2005 ; 7(5) : 747–754.

- [12] **P.MARTY.** Leishmaniose viscérale: épidémiologie, diagnostic et traitement. La Lettre de l'Infectiologue 2010 • Tome XXV – n°5: 186–190.
- [13] **S. SAHA, S.MONDAL, A.BANERJEE.** Immune responses in kala-azar. Indian J Med Res 2006 ; 123 : 245–266.
- [14] **A.DOLEANS, B. GUILLOT, Y. ISSABRE, J.FRENEY.** Les tests rapides en bactériologie. Ann Biol Clin 2003; 61: 379–92.
- [15] **H.GAIL.** College of American Pathologists Proposal for the Oversight of Laboratory–Developed Tests. Arch Pathol Lab Med 2011; 135 (11): 1432–35.
- [16] **R.JHICKS, R. HAECKEL, C. PRICE .** Recommendations and opinions for the use of point-of-care testing for hospitals and primary care: summary of a 1999 symposium. Clin Chim Acta 2001; 303 : 1–17.
- [17] **E .RANNOU.** Les tests rapides d'orientation diagnostique. thèse diplôme d'état de Docteur en pharmaceutique. université Claude Bernard–Lyon 1 2013.
- [18] **P.BOUSQUET, J.DAURES.** Principes, caractéristiques et interprétation des tests de diagnostic et de dépistage. Revue française d'allergologie et d'immunologie clinique 2005 ; 45 : 314–19.
- [19] **A. BESBES, H. POUSSE et al.** LVI du centre tunisien (221 cas) Mes–MalInfec.1994, 24 : 628–634.
- [20] **A.THIMOU, M.HIDA, N. ERRAIMI, Z. BERNOUSSI, M.ESSALMI.** La LVI a propos de 40 cas. Maroc médicale 1996 ; tome 19, N°2 : 10–13.
- [21] **M.EL OUARDI.** Profil de la leishmaniose viscérale dans le service de pédiatrie de l'hôpital Ibn Al Khatib de Fès entre 1998–2001.Thèse de médecine, Faculté de Fès 2001.
- [22] **B.FAUCHER , R. PIARROUX.** Actualités sur les leishmanioses viscérales. La Revue de médecine interne 2011 ; 32 : 544–551

- [23] S.HE et Al. Leishmaniose viscérale et PCR de la confirmation diagnostique à l'origine du lieu de contamination La Revue de médecine interne 2009 ; 30 : 385-479.
- [24] M TARAN, M MOHEBALI. Preparation of a K39sub Recombinant Antigen for the Detection of Leishmania infantum Antibodies in Human: a Comparative Study with an Immunochromatographic Test and Direct Agglutination. Iranian J Parasitol 2007 ; Vol.2, No.2 : 25-33.
- [25] F.JAVIER L.MOLINET. Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect(r) in patients with cutaneous leishmaniasis in Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 May; 108(3): 293-296.
- [26] E. ZIJLSTRA. rK39 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Diagnosis of Leishmania donovani Infection. clinical and diagnostic laboratory immunology 1998: 717-720.
- [27] B. DONDJI. Leishmaniose viscérale au Cameroun.Enquête séro-épidémiologique dans la région de Kousseri, Nord-Cameroun. Santé publique 2001. Manuscrit n° 2317 :418-420.
- [28] J.RUPERT , L. QUINNELL. Evaluation of rK39 Rapid Diagnostic Tests for Canine Visceral Leishmaniasis: Longitudinal Study and Meta-Analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases 2013; 7(1): e1992.
- [29] M.ZUINARA. Comparative Study of rK39 Leishmania Antigen for Serodiagnosis of Visceral Leishmaniasis: Systematic Review with Meta-Analysis. PLOS Neglected Tropical Diseases 2012; 6(1): e1484
- [30] MD GULAM Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. Parasites & Vectors 2010, 3:114.
- [31] G.MATLASHEWSKIi. Diagnosis of Visceral Leishmaniasis in Bihar India: Comparison of the rK39 Rapid Diagnostic Test on Whole Blood Versus Serum. PLOS Neglected Tropical Diseases 2013. 6 (1): e2233.

- [32] **K.RITMEIJER.** Evaluation of a new recombinant k 39 rapid diagnostic test for Sudanese visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 2006; 74(1): 76–80
- [33] The Use of Visceral Leishmaniasis Rapid Diagnostic Tests. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 2008.
- [34] **A-S. MOURA.** Performance of a rapid diagnostic test for the detection of visceral leishmaniasis in a large urban setting. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 2013; 46(5): 589–593.
- [35] **M. BOELAERT.** Evaluation of rapid diagnostic tests: visceral leishmaniasis. *Nature Reviews Microbiology* 2007; 1766: S30–S39.
- [36] Visceral leishmaniasis rapid diagnostic test performance. World Health Organization on behalf of the Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases 2011.
- [37] **D.SINGH.** Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic region of India. *Am J Trop Med Hyg.* 2013 ; 88(2): 222–226.
- [38] **P. MARTY.** La leishmaniose méditerranéenne due à *Leishmania infantum*, mise au point–Intérêt des tests de diagnostic rapide : IT Leish et ID-PAGIA Leishmaniasis®. *Med Trop* 2007; 67: 79–85.
- [39] **S.SUNDAR, M.SAHU.** Non invasive management of Indian visceral leishmaniasis: clinical application of diagnosis by K39 antigen strip testing at a kala azar referral unit. *Clin Infect Dis* 2002; 35 : 581–6.
- [40] **S. SUNDAR.** Comparative evaluation of parasitology and serological tests in the diagnosis of visceral leishmaniasis in India: a phase III diagnostic accuracy study. *Tropical Medicine and International Health* 2007; 12(2): 284–289.

[41] D. OTRANTO,P.PARADIE Coll. Recombinant K39 dipstick immunochromatographic test: a new tool for the serodiagnosis of canine leishmaniosis. J Vet Diagn Invest 2005; 17: 32–37.