

REMERCIEMENTS

ET DEDICACES

Je remercie DIEU

Le tout PUISSANT, le tout MISERICORDE, le tout MAJESTUEUX

D'avoir guidé mes pas dans ce domaine de la Biologie Médicale.

En Vous je repose ma foi et mon espoir, tout ce long chemin gravé

de savoir,

de lutte, de sacrifice et de joie, je ne saurais le faire sans votre

bénédiction.

A ma Famille,

Vous m'avez toujours soutenue et vous continuez à le faire. Je ne

trouverais les mots pour vous exprimer mon affection et mon

estime. Je vous souhaite bonheur, santé et prospérité

A mes Chers Professeurs,

Vous avez guidé nos pas et illuminé notre chemin vers le savoir.

*Vous avez prodigué avec patience et indulgence infinie, vos
précieux conseils.*

*Vous étiez toujours disponibles et soucieux de nous donner la
meilleure formation qui puisse être.*

*Nous vous remercions Professeurs pour tout le
savoir que vous nous avez généreusement transmis ainsi que vos
qualités humaines qui nous ont beaucoup touchées.*

*Veillez trouver dans ce travail le témoignage de notre
reconnaissance et grand estime.*

LISTE DES ABREVIATIONS

AA	: acides aminés
Ac	: anticorps
AEG	: altération de l'état général
Ag	: antigène
ELISA	: enzyme linked immunosorbent assay
IF	: immuno-fluorescence
IFI	: immunofluorescence indirect
L. infantum	: Leishmania infantum
L.chagasi	: Leishmania chagasi
L.donovani	: Leishmania donovani
L.tropica	: Leishmania tropica
MGG	: May-GrünwaldGiemsa
MO	: microscope optique
OMS	: organisation mondiale de la santé
PCR	: polymerase chain reaction
TDR	: test de diagnostic rapide
VIH	: virus de l'immunodéficience humaine
VS	: vitesse de sédimentation

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : principaux foyers et zones d'endémie dans le monde de la leishmaniose
- Figure 2 : répartition géographique de la leishmaniose au Maroc
- Figure 3 : forme amastigote intra-macrophagique de Leishmania
- Figure 4 : forme promastigote de Leishmania
- Figure 5 : phlébotome
- Figure 6 : cycle parasitaire de la leishmaniose
- Figure 7 : corps de leishmanies intra-macrophagiques
- Figure 8 : forme amastigote de Leishmania
- Figure 9: principe de l'IFI
- Figure 10: principe de la technique ELISA
- Figure 11: résultats du diagnostic de leishmaniose par le Western Blot
- Figure 12: les différentes formes du TDR de Leishmaniose. De gauche à droite :
bandelette, cassette, microtubes
- Figure 13 : vue schématique d'un test immunochromatographique (cassette)
- Figure 14 : ID-PaGIA Leishmaniasis antibody test
- Figure 15 : déroulement du test immunochromatographique par cassette
- Figure 16 : test immunochromatographique invalide (la ligne de contrôle n'est pas visible)
- Figure 17 : résultat invalide (présence de sang et de sérum sur le champ de la réaction)
- Figure 18: Test immunochromatographique négatif
- Figure 19 : test immunochromatographique positif
- Figure 20: répartition géographique des patients
- Figure 21: les motifs de consultation retrouvés chez nos patients
- Figure 22 : résultats de l'hémogramme chez nos patients

LISTE DES IMAGES

Image 1 : résultats des TDR « Leishmania IgG/IgMrapid™ ». A gauche positif à IgG, à droite négatif (seule la bande de contrôle apparaît)

Image 2: kit de WB utilisé dans notre laboratoire

Image 3 : A gauche : présence de nombreux corps de leishmanies sous forme amastigote en intra et extra-cellulaire. A droite : WB+ présence de bandes 14 et 16KDA

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1: exemples de TDR de leishmaniose commercialisés

Tableau 2 : Résultats du test immunochromatographique dans notre série

Tableau 3 : résultats du test immunochromatographique et de l'ELISA dans le diagnostic de la leishmaniose dans notre étude

Tableau 4: valeur intrinsèque des examens évalués

Tableau 5 : résultats de la méta-analyse menée par l'OMS évaluant le TDR de leishmaniose avec différents antigènes dans 3 continents

Tableau 6 : les Ag utilisés dans la méta-analyse de l'OMS

Tableau 7 : sensibilité et spécificité de 2 TDR utilisant l'Ag rK39 : IT-Leish® et ID-PaGIA® chez les patients non séropositifs

Tableau 8 : sensibilité et spécificité des 2 TDR : IT-Leish® et ID-PaGIA® chez les patients VIH+

PLAN

PARTIE THEORIQUE.....	14
I– Epidémiologie de la leishmaniose viscérale	15
A– Répartition géographique	15
B– Agent pathogène	17
1– Classification	17
2– Morphologie	17
C– Vecteurs, réservoir et transmission	19
D– Cycle évolutif.....	19
II– Clinique de la leishmaniose	20
III–Diagnostic biologique.....	21
A- Signes d'orientation.....	21
B- Diagnostic de certitude.....	21
1– Diagnostic direct.....	21
2– Diagnostic indirect.....	24
a– IFI	24
b– ELISA.....	26
c– Western Blot.....	27
d– TDR	28
• Définition et historique des TDR	28
• Caractéristiques générales.....	29
• Anatomie du TDR	30
• Les différents types des TDR de Leishmaniose	32
• Principe.....	32
• Validation des résultats	34
• Lecture et interprétation des résultats	35
• Validation des TDR sur le terrain.....	36

PARTIE PRATIQUE	36
I-MATERIEL ET METHODES	36
II-RESULTATS	38
A- Données épidémiologiques	38
1- Nombre de cas, âge et sexe	38
2- Origine géographique	38
B- Données cliniques	39
1- Motif de consultation	39
2- Signes cliniques	39
a- Signes généraux.....	39
b- Signes physiques.....	40
C- Hémogramme	40
D- Examens de certitude	41
III-DISCUSSION	46
A- Performances du test rapide	46
1- Sensibilité et spécificité.....	46
2- Choix de l'antigène	47
B- Limites	49
CONCLUSION	51
RESUME	53
BIBLIOGRAPHIE	55

INTRODUCTION:

Les leishmanioses sont des parasitoses du système des phagocytes mononucléés causées par un protozoaire flagellé du genre *Leishmania* et transmises par des moucheron hémaphages appelés phlébotomes.

Plusieurs formes cliniques ~~varient~~, allant de l'atteinte cutanée localisée à la forme viscérale, grave en l'absence de traitement bien conduit. Cette diversité clinique est due d'une part à multitude d'espèces et d'autre part à la réponse immunitaire de l'hôte infecté.

En plus, la leishmaniose viscérale peut dans certains cas évoluer vers la leishmaniose dermique post-kalaazar qui nécessite un traitement long et coûteux, ou même être responsable de flambées épidémiques avec augmentation de taux de mortalité.

Les techniques proposées pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, que ce soit pour un diagnostic direct (méduillogramme, PCR, culture) ou pour un diagnostic sérologique (IF, ELISA..) présentent certains inconvénients. Ces méthodes sont en effet, des méthodes longues, coûteuses et/ou nécessitant un laboratoire spécialisé et un personnel qualifié. Or, dans certaines situations d'urgence, essentiellement en zone d'endémie ou en ca de moyens réduits, des tests rapides, simples et peu coûteux paraissent indispensables.

De ce fait, les TDR ont été conçus afin de répondre à ces exigences diagnostiques. En effet, devant un tableau clinique évocateur, les TDR de Leishmaniose peuvent être proposés en première intention en particulier chez l'enfant où le principal diagnostic différentiel évoqué est la leucémie.

Ces tests ont été tout d'abord conçus sur le principe d'immunofiltration ou d'agglutination. Aujourd'hui, la technique immunochromatographique reste la plus populaire.

Cependant, afin d'interpréter les résultats et de valider les résultats sur le terrain, il est indispensable d'étudier les performances de ces tests dans le diagnostic des leishmanioses viscérales.

Notre étude, malgré le nombre d'échantillon limité, a pour but justement de démontrer la sensibilité et la spécificité de ces tests dans le diagnostic de la Leishmaniose viscérale dans une zone considérée comme potentiellement endémique.

PARTIE THEORIQUE

I-Epidémiologie de la leishmaniose :

A-Répartition géographique

La leishmaniose viscérale est présente sur 60 pays répartis sur 4 continents. Son incidence annuelle est estimée à 500000 cas/an, et 90% des cas sont localisés dans 5 pays constituant les plus grands foyers endémiques de leishmaniose : Inde, Bangladesh, Népal, soudan et Brésil. D'autres foyers importants sont représentés par la Chine, l'Asie centrale, l'Afrique de l'Est et le Bassin méditerranéen [2,3].

Les espèces les plus incriminées dans la leishmaniose viscérale sont *L.infantum* (bassin méditerranéen, Afrique subsaharienne, Amérique du Sud, Asie centrale et Chine) et *L.donovani* dans l'Inde et l'Afrique de l'Est. D'autres espèces peuvent être également responsables de leishmaniose viscérale : *L.chagasi* dans la nouveau monde (Amérique) et *L.tropica* (des cas ont été rapportés lors de la guerre du Golf) [4]

Dans la plupart des cas, la leishmaniose viscérale se contracte chez les enfants à cause de l'immaturation de leurs défenses immunitaires et les cas observés chez l'adulte sont souvent dus à un terrain d'immunodépression [5].

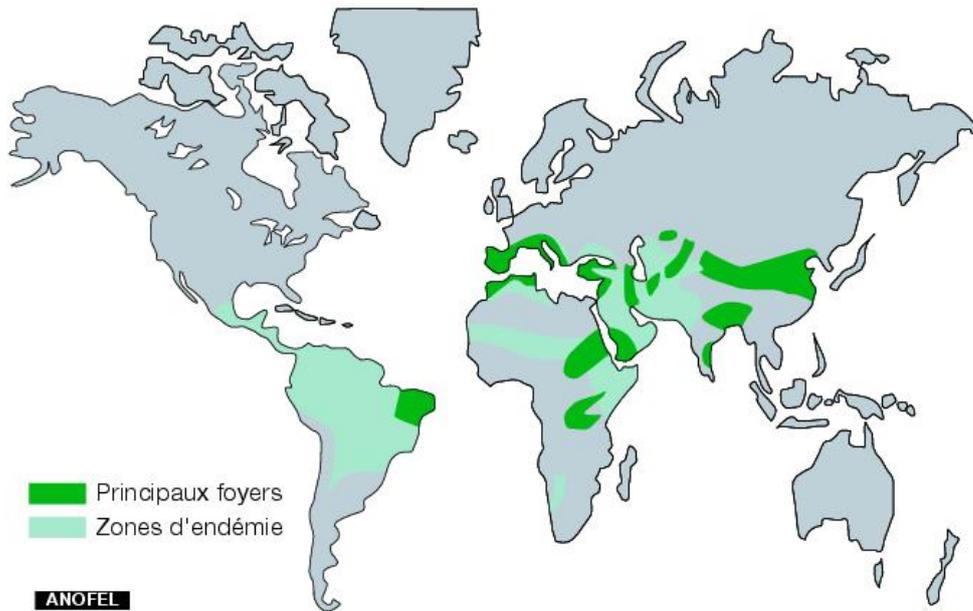


Figure 1 : Principaux foyers et zones d'endémie dans le monde de la leishmaniose (Anofel).

Au Maroc, la leishmaniose viscérale constitue un réel problème de santé publique. Son incidence augmente en période d'été avant la tombée de la pluie avec un maximum en mois d'Août. La *Leishmania infantum* est retrouvée dans 90% des cas et 3 zones sont particulièrement exposées [1,6]. Il s'agit de :

- la zone nord s'étendant de Tanger à Nador en passant par Tétouan, Taounate et El Hoceima
- la zone centre s'étendant en partie sur les plaines de Saiss, du Gharb et de l'atlantique et touchant les villes de Fès, Meknès, Sidi Kacem et Rabat.
- la zone sud : comprenant la région d'Errachidia et Arfoud



Figure 2 : répartition géographique de la leishmaniose au Maroc [10].

B-Agent pathogène

1-Classification :

Taxonomie : La Leishmania est un protozoaire flagellé appartenant à :

- ✓ Embranchement : Protozoa
- ✓ Sous-embranchement : Sarcomastigophora
- ✓ Classe : Zoomastigophorea
- ✓ Famille : Trypanosomatidae
- ✓ Ordre : Kinetoplastida
- ✓ Genre : Leishmania

2-Morphologie : [4,7]

Les Leishmania sont des parasites dimorphiques et hétéroxènes qui présentent au cours de leur cycle 2 stades évolutifs distincts :

-stade amastigote : sans flagelle extériorisé, il est intra-macrophagique et se retrouve chez l'hôte vertébré dont l'homme. La forme amastigote est ovoïde faisant 2 à 6 μm et présentant au MO après coloration au May-Grünwald-Giemsa, deux inclusions pourpres caractéristiques : le noyau arrondi et le kinétoplaste en bâtonnet plus sombre.

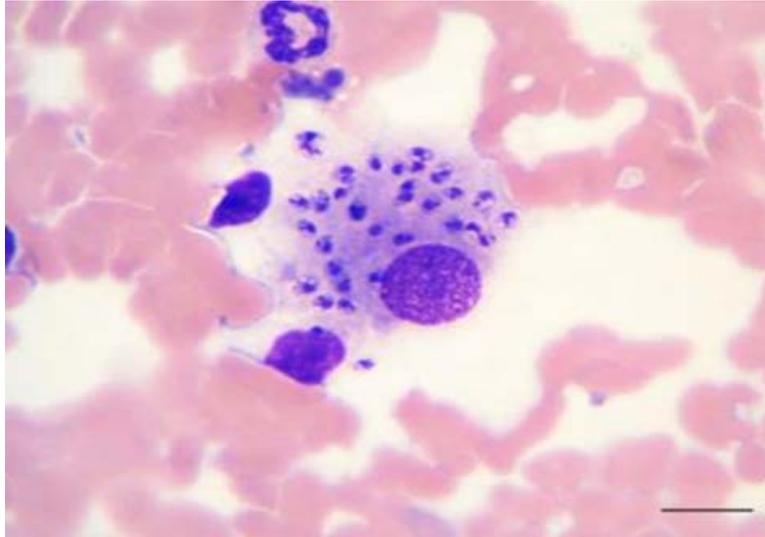


Figure 3 : Forme amastigote intra-macrophagique de Leishmania

-stade promastigote : libre et mobile grâce à son flagelle. Il est présent dans l'intestin du phlébotome et dans les milieux de culture. Sa forme est allongée faisant 10 à 25 μm de long avec un noyau central, un kinétoplaste en position antérieur et un flagelle s'échappant de l'extrémité antérieure.

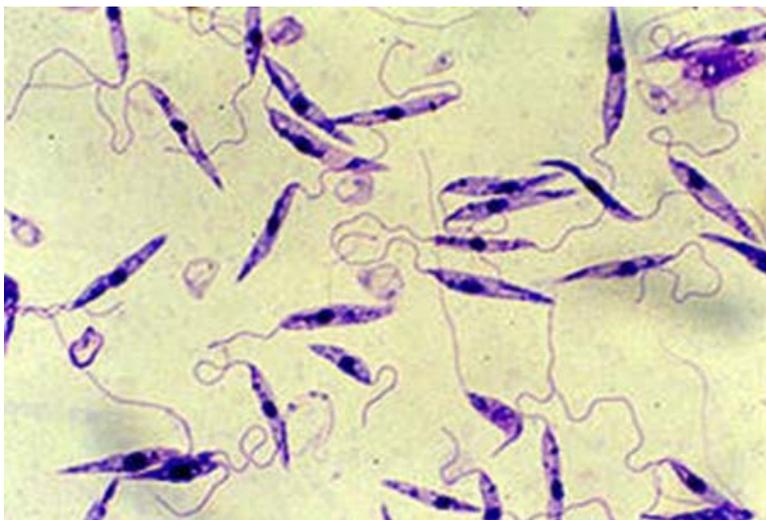


Figure 4 : Forme promastigote de Leishmania

C-Vecteurs, réservoir et transmission :

Les réservoirs naturels des leishmanies sont les mammifères. Ils appartiennent à divers ordres : rongeurs, primates... dans ce cas la leishmaniose est dite zoonotique. Quand l'homme est le seul réservoir du parasite, la leishmaniose est dite anthroponotique. L'infection se transmet par pique d'un moucheron hématophage appelé le phlébotome. L'activité de ces phlébotomes est crépusculaire et nocturne et leur pique est douloureuse. Les autres modes de transmission sont rares mais possibles. Il s'agit de transmission par échange de seringue chez les toxicomanes, ou exceptionnellement les transmissions transfusionnelles et congénitales [1,8].



Figure 5 : phlébotome

D-Cycle évolutif :

Le parasite a un cycle de vie hétéroxène nécessitant deux hôtes : le vecteur et le mammifère ou hôte vertébré.

-Chez le vecteur : Au cours de son repas sanguin, le parasite sous forme amastigote est entraîné au niveau du tube digestif où il est transformé en promastigote après un cycle complexe. Les promastigotes ayant résisté aux enzymes digestifs vont migrer au niveau des pièces buccales, se multiplier et seront par la suite inoculés dans le derme de l'hôte vertébré lors d'une autre pique.

-Chez le mammifère : Les promastigotes injectés dans le derme vont passer dans la circulation générale et seront repris par les cellules réticuloendothéliales, où ils se multiplieront sous forme amastigotes, entraînant la lyse successive des macrophages. Ces amastigotes seront ensuite repris par d'autres macrophages mais aussi par le phlébotome lors d'un nouveau repas sanguin [9].

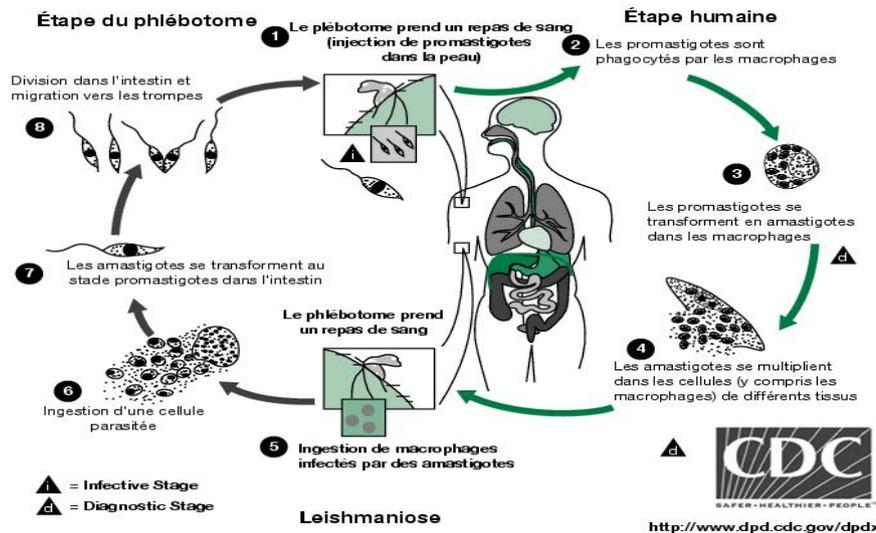


Figure 6 : cycle parasitaire de la leishmaniose [11]

II-Clinique de la leishmaniose :

La période d'incubation moyenne est de 3 à 6 mois et le plus souvent, le chancre d'inoculation passe inaperçu. Le signe le plus précoce est la fièvre, et typiquement le tableau clinique est fait d'une triade classique associant une fièvre irrégulière anarchique, survenant plusieurs semaines entrecoupée de période d'apyrexie, une pâleur intense et une splénomégalie homogène et de grande taille [1,6]. En plus de la splénomégalie, et comme conséquence à l'hyperplasie du système des phagocytes mononucléés, une hépatomégalie et des adénopathies superficiels et profondes peuvent exister. L'amaigrissement est souvent présent surtout au niveau des membres, contrastant avec un appétit conservé et une

distension abdominale secondaire à l'hépto-splénomégalie[12]. Chez l'enfant, ce tableau clinique est souvent complet facilitant ainsi le diagnostic de la leishmaniose viscérale. Cependant chez l'adulte, plusieurs signes peuvent manquer et les formes pauci-symptomatiques voire asymptomatiques sont possibles[13].

III-Diagnostic biologique :

A-Signes d'orientation :

-Hématologiques : la numération formule sanguine révèle une atteinte des lignées sanguines avec bicytopénie ou pancytopénie [14]. L'anémie est la plus fréquente. Elle est normochromenormocytairearégénérative puis devient microcytaire et s'aggrave. La leucopénie est également souvent observée favorisant la survenue d'infections en cas de neutropénie. Par contre, la thrombopénie reste souvent modérée et ne s'aggrave qu'en fin d'évolution de la maladie [14,15].

-Biochimiques :

La VS : souvent élevée, pouvant atteindre 100mm la première heure.La protidémie est généralement augmentée mais peut être normale ou diminuée. L'électrophorèse des protéines met en évidence une hypergammaglobulinémiopolyclonale avec hypoalbuminémie [14,15].

B-Diagnostic de certitude :

1-Diagnostic direct :

-Médullogramme : Le médullogramme représente l'examen clé et le gold standard dans le diagnostic de la leishmaniose. Le prélèvement est réalisé le plus souvent au niveau de la crête iliaque chez l'enfant et au niveau du sternum chez l'adulte. La lecture après coloration au May-GrünwaldGiemsa (MGG) est faite au

grossissement 100 et doit être minutieuse et prolongée. Les corps de leishmanies sous formes amastigotes apparaissent typiquement de petite taille (2 à 5 μ m) avec un noyau rond ou ovalaire de couleur pourpre et un kinétoplaste de forme punctiforme ou bacilliforme. Ces corps sont retrouvés généralement en extra-cellulaireconséquence du l'étalement du frottis, mais peuvent se retrouver également en intra-macrophagique.

-Les Leishmania peuvent être retrouvées également au niveau du sang périphérique après une leucocytocentrifugation avec concentration. C'est une technique qui consiste à concentrer les leucocytes par centrifugation et après hémolyse par une solution de saponine. Sa sensibilité est meilleure si le sujet est immunodéprimé [1,6].

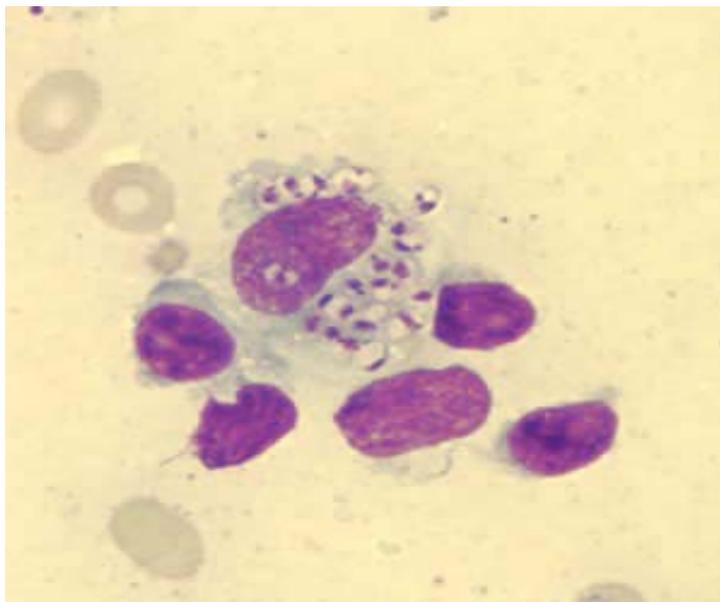


Figure 7 :Corps de leishmanies intra-macrophagiques

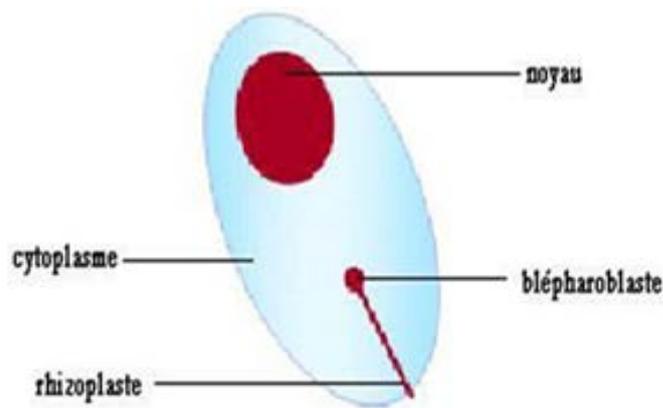


Figure 8 : Forme amastigote [16]

-La culture

La culture est réalisée sur des milieux spéciaux : milieu NNN (Novy, Mc Neal et Nicolle) qui est le plus utilisé en pratique courante [18], ou équivalent comme le milieu de Schneider. Elle permet d'obtenir les formes promastigotes flagellés et mobiles [4].

L'incubation se fait entre 24 et 26° pendant 3 semaines au minimum. La culture est longue et le délai de pousse augmente si la charge parasitaire est faible. Pour ces raisons, la culture ne doit être déclarée négative qu'après 4 à 5 semaines de culture avec un repiquage toutes les semaines [17].

La culture permet, en plus du diagnostic de certitude de la parasitose, l'isolement de la souche de Leishmania en vue de son identification [18]. Son principal inconvénient reste la durée de culture [19].

-PCR :La détection et l'amplification de l'ADN parasitaire par PCR se fait sur sang médullaire, sang périphérique ou même sur le sérum. Son intérêt réside dans le suivi thérapeutique, la détection des rechutes chez l'immunodéprimé [20] et l'étude des sujets porteurs asymptomatiques [1,14]. Elle va permettre également de diagnostiquer l'espèce en cause (profil isoenzymatique, génotype, phénotype) et de

tester sa sensibilité aux anti-leishmanicides ce qui va aider à assurer une meilleure prise en charge du patient [14].

2-Diagnostic indirect :

La technique de référence est l'immunofluorescence indirecte (IFI) sur promastigotes de culture. L'ELISA a une spécificité et une sensibilité qui varient selon les antigènes utilisés.

Le Western-blot est la technique la plus sensible. C'est un test de confirmation réservé aux laboratoires spécialisés et qui permet de différencier les sujets réellement malades des simples porteurs asymptomatiques.

L'hémagglutination indirecte, l'électrosynérèse et l'immunoélectrophorèse ne sont presque plus utilisées du fait de leur sensibilité diminuée. Finalement il existe les tests de détection rapide (TDR) dont l'intérêt, les performances et limites seront détaillés ultérieurement.

a-IFI :

-Principe : Il consiste à mettre en contact le sérum du patient (préalablement dilué avec des dilutions successives) avec un antigène figuré constitué de promastigote. En cas de présence d'anticorps anti-leishmaniens chez le patient, il y aura formation de complexe antigène-anticorps qui sera révélé après adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à la fluorescéine [21].

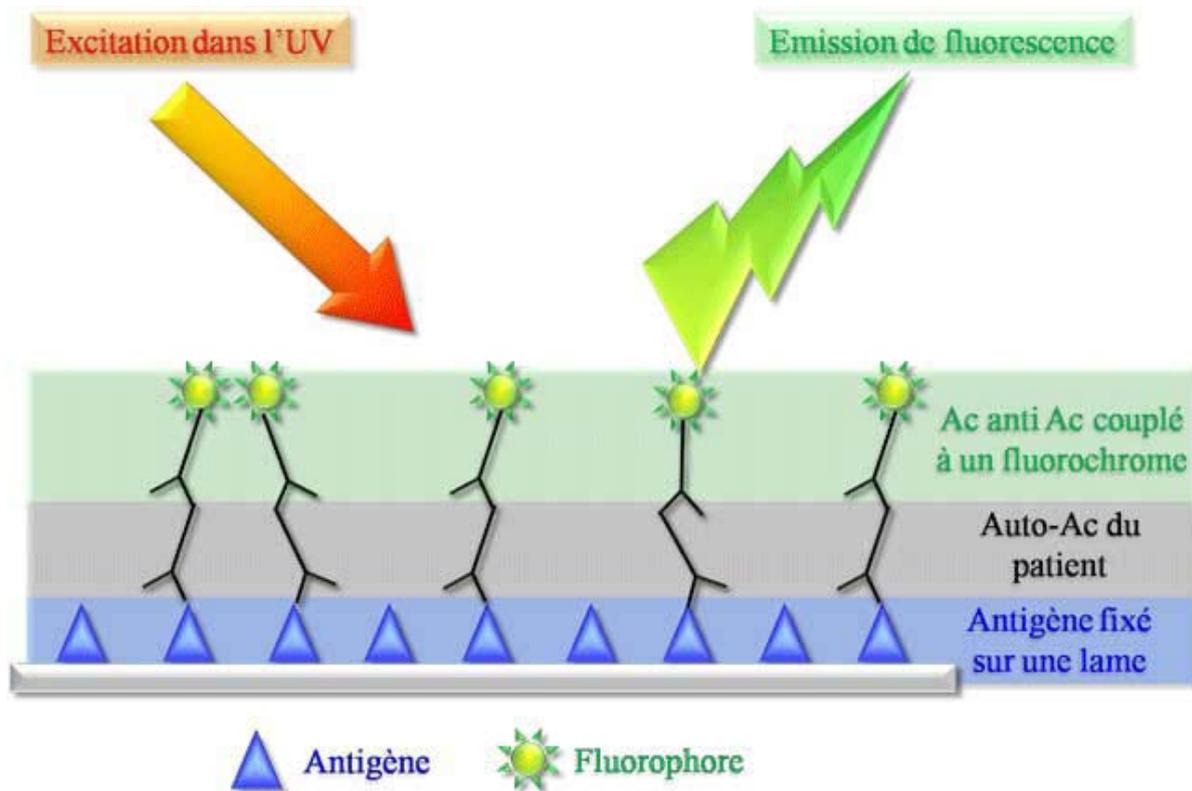


Figure 9: Principe de l'IFI [21]

-Résultats :

La réaction est dite positive si un liseré vert fluorescent apparaît autour de toute la forme promastigote. Si la fluorescence se limite au noyau, cela peut s'agir soit d'une interférence dans le cadre de connectivité soit d'un portage asymptomatique. Par contre quand la réaction est négative, la leishmanie reste rouge sans fluorescence visible [21].

-Performance : IFI est la méthode sérologique de référence. Sa sensibilité dépasse les 90% et son seuil de positivité est de 1/100 [5]. Les faux positifs sont possibles en cas de paludisme et de trypanosomose mais restent rares.

-Inconvénients : c'est une technique non adaptée au terrain, nécessite une source d'ultraviolet [12]

b-ELISA :

-Principe : ELISA est une technique immuno-enzymatique permettant la mise en évidence du complexe antigène-anticorps grâce à la formation d'une réaction colorée par action d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps et après ajout d'un substrat.

En effet, les anticorps présents dans le sérum à tester vont réagir avec les antigènes préalablement adsorbé sur la phase solide de polystyrène. Un premier lavage va éliminer les immunoglobulines en excès. Puis, le conjugué enzymatique est ajouté et va se fixer spécifiquement aux complexes Ag-Ac. Un deuxième lavage va permettre d'éliminer le conjugué en excès. Enfin, le substrat est ajouté et va donner une coloration bleue qui vire au jaune après l'ajout d'une solution d'arrêt (Figure10)

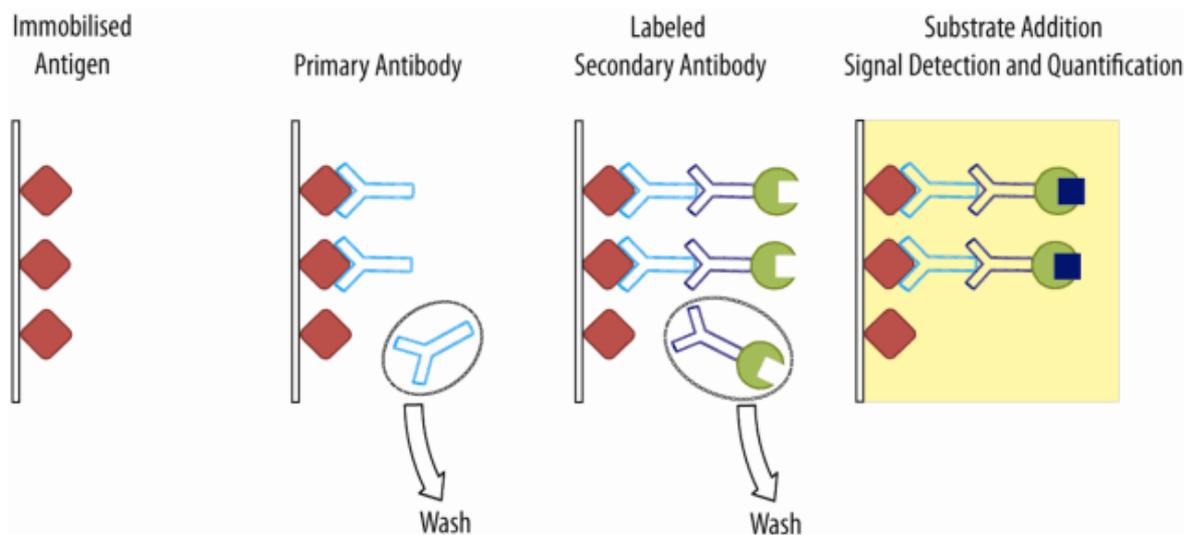


Figure 10: principe de la technique ELISA [21]

- Avantages : C'est une technique qualitative et quantitative permettant aussi bien la mise en évidence que le dosage des anticorps anti-leishmaniens. L'avantage qu'elle présente c'est qu'elle est automatisable et peut être répétée pour le suivi thérapeutique du patient, mais elle nécessite un matériel de lecture adapté

- Performances : Sa sensibilité est très bonne mais sa spécificité dépend de l'antigène utilisé [12].
- Limites : L'absence d'augmentation du titre d'anticorps n'exclut pas la possibilité d'une infection et des réactions croisées avec *Trypanosomacruzi* sont possibles dans certaines zones d'endémie réalisant des faux positifs.

c-WESTERN-BLOT :

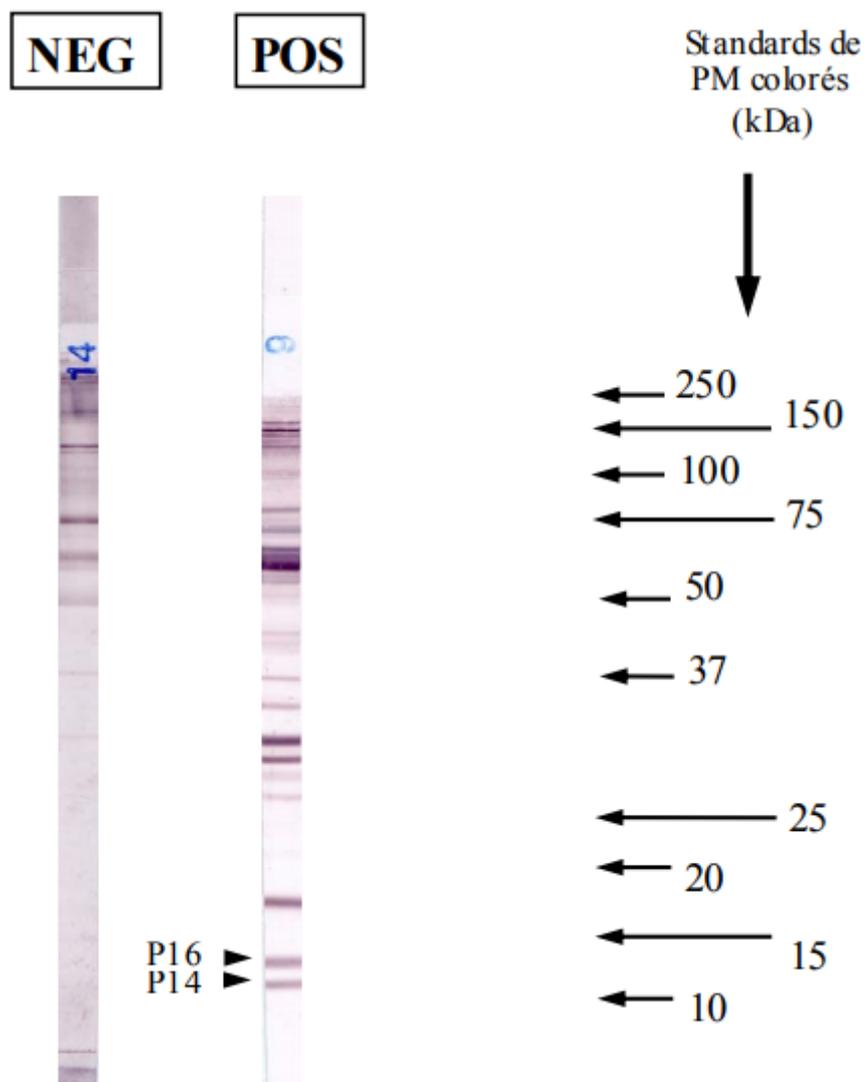


Figure 11: résultats du diagnostic de leishmaniose par le Western Blot

Le Western Blot ou immunoempreinte est un test qualitatif de diagnostic sérologique de la leishmaniose.

–Principe : Les antigènes de *Leishmania infantum* issus de promastigotes, sont préalablement fixés sur les bandelettes de nitrocellulose. Lors de l'incubation du sérum à tester dans le puit avec la bandelette, les anticorps anti-leishmaniens éventuellement présents dans le sérum vont se fixer sélectivement sur les antigènes correspondants [23].

Ensuite, Les complexes Ag-Ac sont révélés par l'adjonction d'un conjugué (phosphatase alcaline anti-IgG). Ces complexes vont réagir avec le substrat et vont se révéler sous formes de bandes transversales de couleur violette.

–Lecture : La présence de bandelettes 14kDa et/ou 16kDa, spécifiques de la LV, suffit pour considérer le test comme étant positif et confirmer ainsi la présence d'anticorps anti-leishmaniens dans le sérum testé [24]

–Avantages : C'est une technique de choix pour le diagnostic de la leishmaniose viscérale, car c'est la technique la plus sensible et la plus spécifique qui peut être utilisée même chez l'immunodéprimé [22]. Elle permet de différencier un sujet séronégatif, d'un sujet malade et d'un porteur asymptomatique [27].

–Limites : Malheureusement à cause de son coût élevé, le Western Blot ne doit être utilisé que dans un but de confirmation dans les situations de doute diagnostique ou en cas de dissociation entre les résultats de l'examen direct et la sérologie.

d-Les tests de diagnostic rapide :

- Définition et historique :

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), un TDR est un « test précis, simple, peu coûteux, facile à interpréter, stable dans des conditions extrêmes, ne nécessitant que peu ou pas de traitements spéciaux au préalable et peu d'échantillons biologiques » [25].

Grâce à ces propriétés, le TDR permet non seulement l'orientation diagnostique en quelques minutes, mais également son utilisation au lit même du malade, là où il n'y a pas de laboratoire ou de personnels spécialisés [26].

Les premiers tests de diagnostic rapide (TDR) ont été initialement développés en 1950 pour le diagnostic de la grossesse chez la femme. Les applications se sont ensuite diversifiées pour inclure la recherche de toxiques (détection salivaire de stupéfiants), d'antigènes viraux et parasitaires, de toxines bactériennes, d'anticorps dirigés contre certaines infections virales (sérologie du VIH en urgence) et même certaines indications non médicales notamment l'analyse de paramètres biochimiques dans l'eau (par ex. piscines), l'air, les aliments, etc.

- Caractéristiques générales [28]:

Rapidité :

Comme tout autre examen biologique, il existe trois phases analytiques lors de la réalisation d'un test de diagnostic rapide. La durée de ces trois phases est particulièrement diminuée. En effet, la première phase correspondant à la phase pré-analytique est réduite car le prélèvement n'a pas besoin d'être acheminé au laboratoire et le test peut être réalisé au lit même du malade. La deuxième phase est la phase analytique qui est également courte car elle ne nécessite pas d'intervention particulière sur l'échantillon. Enfin, la dernière étape est l'étape post-analytique incluant la lecture et l'interprétation du test qui sont rapides et faciles.

Simplicité :

La réalisation du test est très simple : une goutte du sérum à analyser est déposée dans la zone d'absorption et la lecture se fait quelques minutes plus tard.

Délocalisation des tests :

Les tests de diagnostic rapides peuvent être réalisés hors laboratoire et ne nécessitent pas de personnel qualifié ni de contrôle de biologiste, ce qui devrait économiser le temps et le coût.

- Anatomie du TDR

Les tests de diagnostic rapide de Leishmaniose peuvent se présenter sous différentes formes : bandelettes, cassettes ou microtubes (figure)

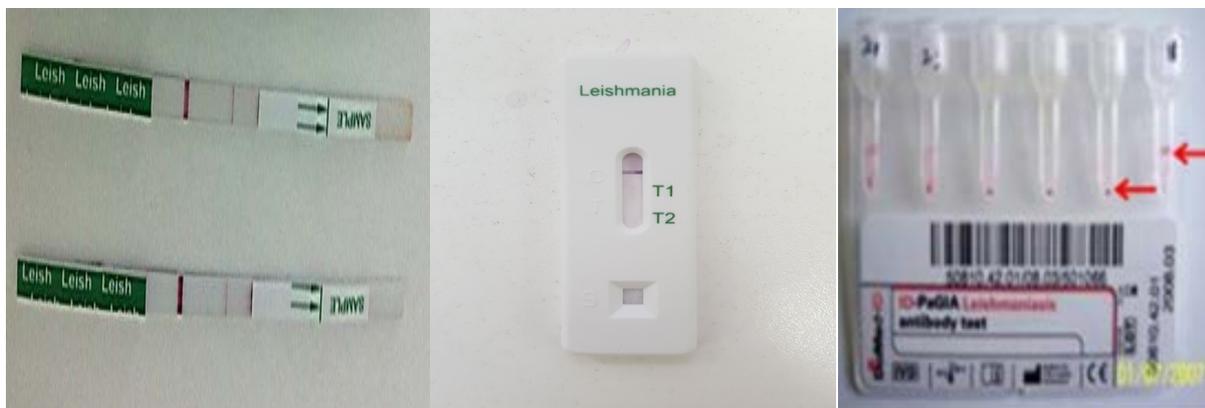


Figure 12: les différentes formes du TDR de Leishmaniose. De gauche à droite : bandelette, cassette, microtubes

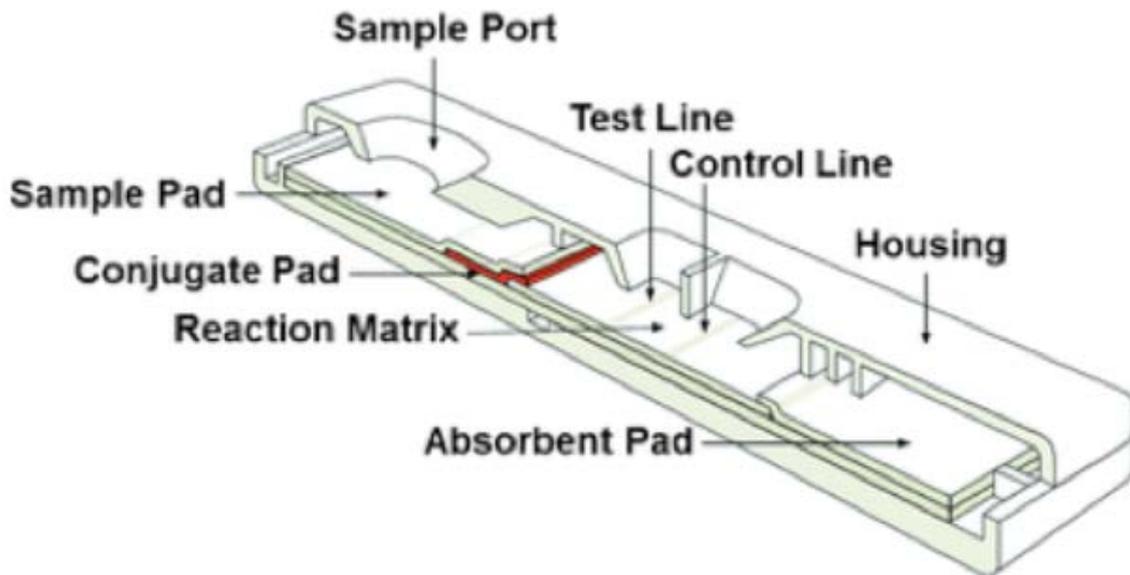


Figure 13 : vue schématique d'un test immunochromatographique (cassette)

Sample pad : tampon d'échantillon, sample port : orifice d'échantillon, conjugate pad : tampon conjugué, reaction matrix : matrice de réaction, absorbent pad : tampon d'absorption, test line : ligne de test, control line : ligne de contrôle, housing : boîtier

- Tampon d'échantillon : Il est imprégné de solution tampon, de surfactants, d'agents bloquants, lysants et desséchants. Son rôle est de traiter l'échantillon en modifiant sa variabilité chimique.
- Tampon conjugué : c'est le support où va se former le complexe Ag-Ac qui sera entraîné le long de la bandelette.
- Membrane de réaction : c'est une bande de nitrocellulose comportant deux lignes (contrôle et test) qui facilitent la capture du complexe Ag-Ac.
- Tampon absorbant : il va permettre d'absorber l'excès de l'échantillon pour éviter la formation de faux positifs.

–Support et boîtier : le support se trouve sous les tampons afin de les maintenir en place. Le boîtier va permettre de préserver la bandelette, de maintenir l'alignement des différents composants et de visualiser les résultats.

- Les différents TDR de Leishmaniose commercialisés

Deux antigènes sont utilisés dans les TDR de la leishmaniose. Il s'agit de l'Ag rKE16 et de l'Ag rK39. Le rK39 étant l'Ag le plus utilisé en pratique courante dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale. Il s'agit un Ag recombinant de 39 AA issu de *Leishmania donovani*.

Tableau 1: Exemples de TDR de leishmaniose commercialisés

Réactif	Fabricant	format	Antigène
CrystaKA	Span Diagnostics	Bandelette	rKE16
DiaMed-ITLEISH	Bio-Rad	Cassette	rK39
Kalazar Detect	InBios	Bandelette	rK39
Signal-KA*	Span Diagnostics	Cassette	rKE16
OnSite Leishmania Ab rapid Test	CTK Biotech	bandelette	rK39

- Principe [27] :

Les TDR sont des techniques immunologiques, c'est-à-dire des réactions entre des anticorps et des antigènes qui font apparaître une coloration particulière permettant d'interpréter immédiatement le résultat.

Les TDR de la leishmaniose sont des tests immunochromatographiques sous forme de cassette ou de bandelette sensibilisée avec un antigène recombinant. Ce sont donc des tests détectant les anticorps anti-leishmaniens.

Nous donnons à titre d'exemple 2 tests de diagnostic commercialisés, permettant la détection d'anticorps anti -leishmaniens dirigés contre la protéine rK39 :

ID-PaGIA Leishmaniasis antibody test®

C'est un test basé sur le principe de l'agglutination, présenté en microtubes individuels sous forme d>ID-Cards, avec des particules de gel sensibilisées avec de l'Ag rK39. Une protéine recombinante spécifique du complexe Leishmania donovani est mélangée avec du sérum du patient et centrifugé à travers le gel de filtration. Lors d'une réaction positive les particules agglutinées restent sous forme d'une ligne rouge à la surface du gel. Lors d'une réaction négative les particules non agglutinées forment un amas rouge au fond du microtube.



Figure 14 : ID-PaGIA Leishmaniasis antibody test

• IT-Leish®

Ce test immuno-chromatographique utilise une bandelette sensibilisée par l'antigène recombinant rK39. Le sérum est déposé dans un puit contenant un conjugué. Les anticorps du patient captés par ce conjugué réagissent avec l'Ag rK39 présent sur la bandelette. Lors d'une réaction positive un trait coloré apparaît sur la bandelette couplé à un second très noir, le contrôle de la réaction. Lors d'une réaction négative, seul le second trait de contrôle apparaît.

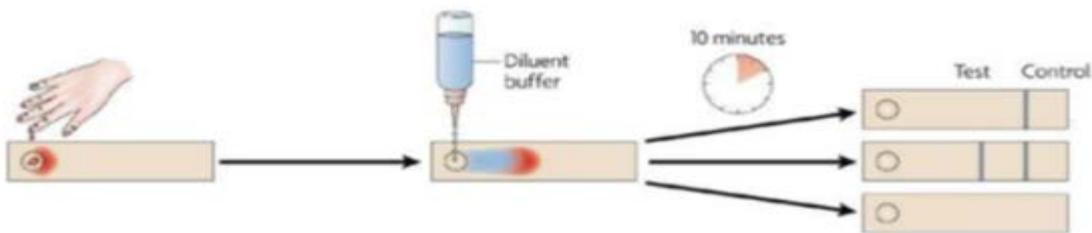


Figure 15 : déroulement du test immunochromatographique par cassette

• Validation des résultats [32]

Les résultats sont valides quand la bandelette de contrôle est clairement visible et qu'il n'y a plus de sang ou de sérum dans le champ de la réaction.

Cependant les résultats ne sont pas valides si la ligne de contrôle n'est pas visible (figure 16) ou s'il existe encore du sang ou du sérum sur la bandelette (fig 17).

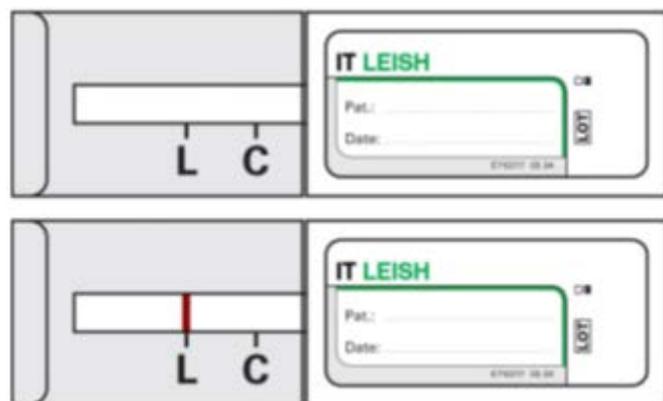


Figure 16: test immunochromatographique invalide (la ligne de contrôle n'est pas visible)

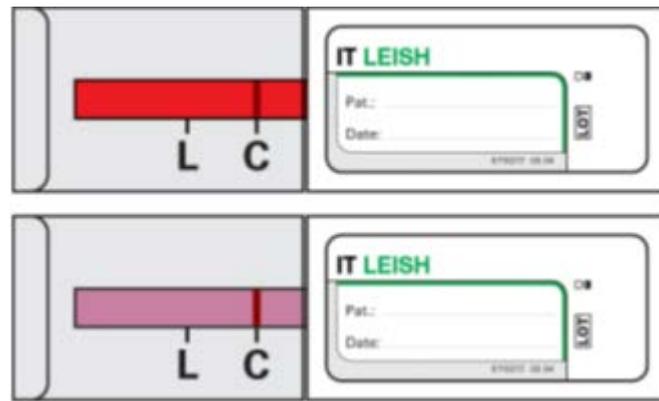


Figure 17 : résultat invalide (présence de sang et de sérum sur le champ de la réaction)

- Lecture et interprétation des résultats :

Le résultat est négatif si absence de ligne au niveau de la zone de réaction (figure 18)

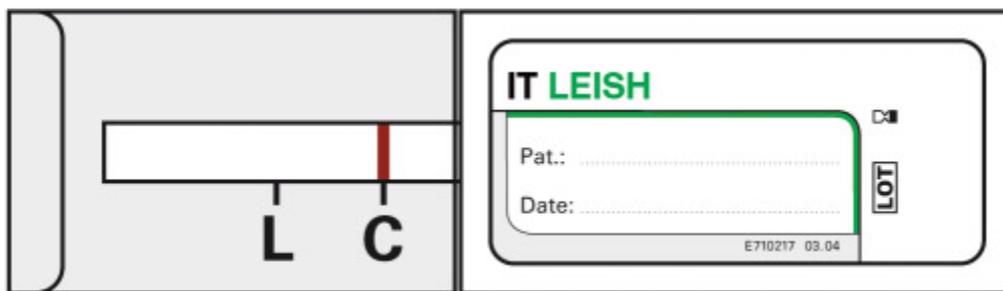


Figure 18: test immunochromatographique négatif

Le résultat est considéré comme positif si présence de deux lignes colorées : une ligne de contrôle au niveau de la zone témoin et une autre ligne dans la zone de réaction (figure 19). Ce résultat signe la présence d'anticorps anti-leishmaniens. Cependant l'intensité de cette ligne de réaction peut varier en fonction de la quantité d'anticorps présents au niveau de l'échantillon à tester : une ligne très claire doit donc également être considérée comme positive.

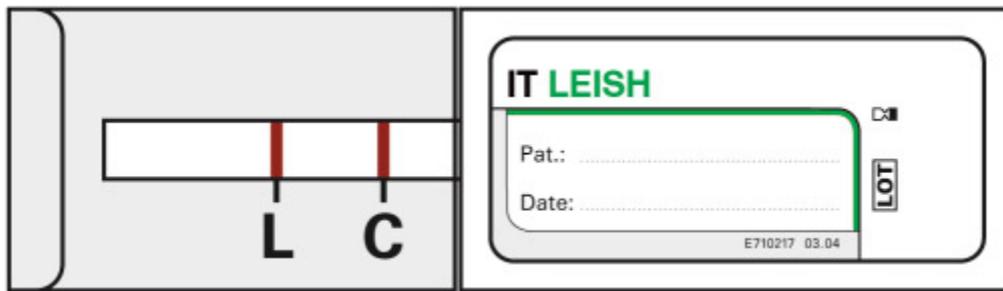


Figure 19 : test immunochromatographique positif

- Validation des TDR sur le terrain

La validation sur le terrain des TDR est une étape indispensable car elles vont permettre de valider ces tests dans les conditions de terrain réelles, et ainsi détecter s'il y a un problème d'utilisation ou de performances par rapport aux laboratoires de référence [29]. En effet, les données de la littérature rapportent une différence de performances des TDR entre les évaluations réalisées dans les laboratoires de références et celles effectuées dans leurs conditions finales d'utilisations sur le terrain.

Cependant ces évaluations ne sont faciles à réaliser car la taille de la population atteinte doit être suffisamment élevée pour pouvoir valider l'étude sur le terrain [30].

I- MATERIELET METHODES

Période et type de l'étude :

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au service de Parasitologie-Mycologie du CHU Hassan II de Fès, étalée sur une période allant de Février 2016 à Juillet 2018.

Cas inclus :

Cette étude a concerné les patients chez qui une leishmaniose viscérale a été suspectée et qui ont bénéficié d'un test de diagnostic rapide ainsi que d'autres examens permettant de confirmer ou non la présence de cette pathologie.

Cas exclus :

Nous avons exclu de cette étude les patients dont les renseignements cliniques et biologiques n'ont pas pu être récupérés. Il s'agit essentiellement de patients non hospitalisés, suivis à tire externe mais également ceux dont le dossier était incomplet.

Collecte des données :

Le diagnostic a été effectué au sein du service de parasitologie-mycologie du CHU Hassan II de Fès. Les renseignements cliniques ainsi que le reste du bilan biologique ont été collectés à partir de dossiers des malades hospitalisés dans les différents services du centre hospitalier. Une fiche d'exploitation standard, incluant les données épidémiologiques, cliniques et paracliniques, a été confectionnée afin de faciliter la collecte des données.

Les différents examens de certitude utilisés chez nos patients :

Après réception d'un prélèvement sanguin périphérique, le premier test réalisé en cas de suspicion de Leishmaniose viscérale a été le test immunochromatographique « Leishmania IgG /IgMRapid™ » utilisant l'Ag rK39. Quel que soit le résultat obtenu, une confirmation sérologique par ELISA était nécessaire.

En cas de discordance entre les 2 examens sérologiques (TDR et ELISA), le recours au Western Blot nous permettait de trancher.

Après le diagnostic sérologique, une confirmation par médullogramme était nécessaire afin de rechercher la présence de corps de leishmanies sur sang médullaire.

II- RESULTATS

A- Données épidémiologiques :

1-Nombre de cas,âge et sexe :

Au total, 107 cas ont été inclus dans l'étude. L'âge moyen de nos patients était de 21 ans avec des extrêmes allant de 6 mois à 50 ans. La majorité des cas étaient des enfants (66.3%) et une nette prédominance masculine a été observée (sexe ratio 1.8).

2-origine géographique :

La majorité des patients provenait de la région de Fès et ses environs

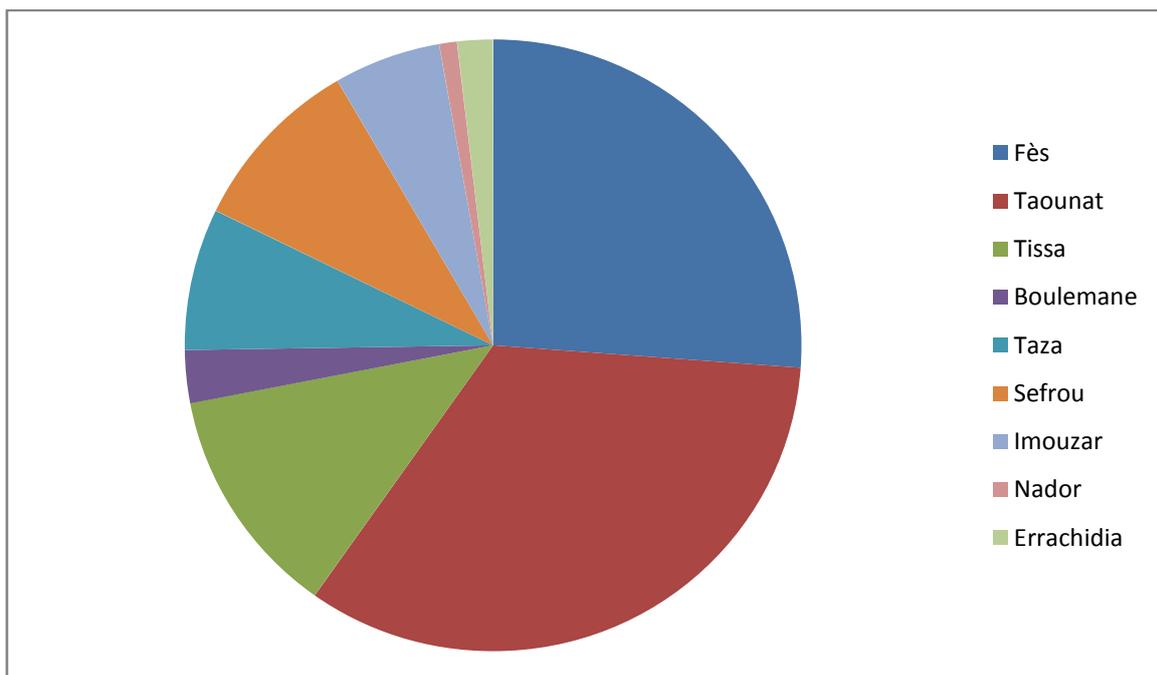


Figure 20: répartition géographique des patients

B-Données cliniques :

1-Motif de consultation :

La fièvre était le motif de consultation le plus fréquent, suivie d'altération de l'état générale et de pâleur (figure 21).

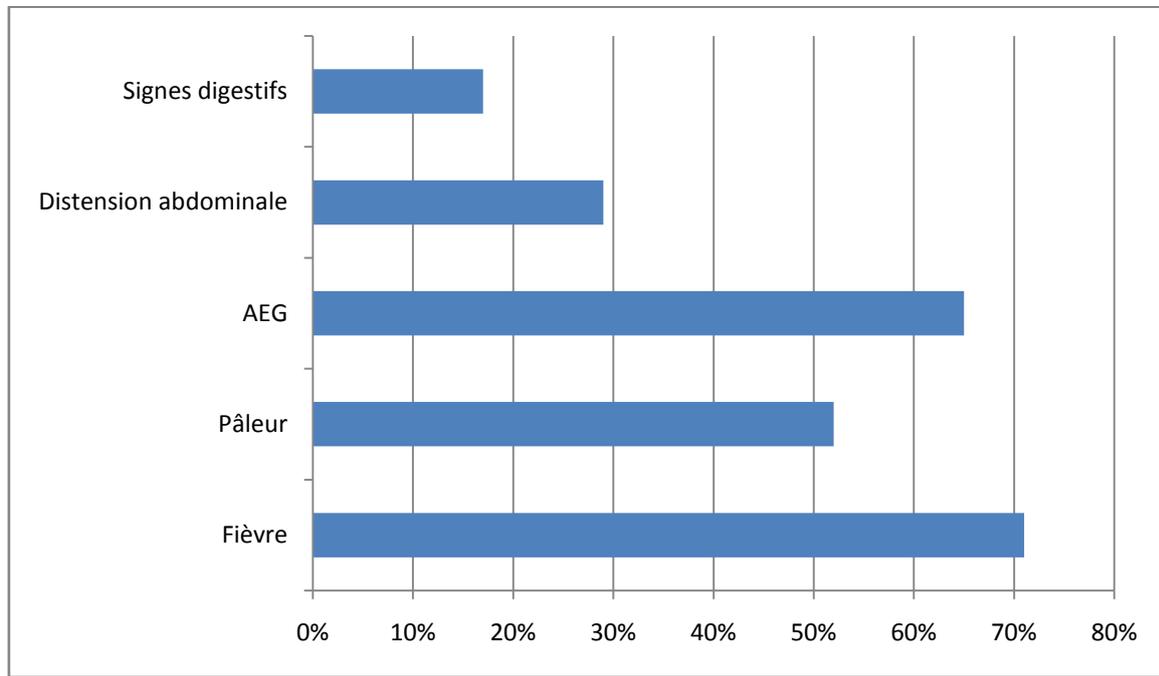


Figure 21: les motifs de consultation retrouvés chez nos patients

2-Signes cliniques :

a-Signes généraux :

- La fièvre a été retrouvée chez 71% des patients.
- La pâleur cutanéomuqueuse a été retrouvée chez 61% patients.
- L'altération de l'état générale avec ou sans amaigrissement a été notée chez 65% patients.

b-examen physique :

La splénomégalie a été le signe clinique le plus retrouvé à l'admission (66% des patients). Elle a varié d'un simple rebord costal à une taille énorme dépassant parfois l'ombilic.

C-Hémogramme :

La numération formule sanguine a retrouvé une pancytopénie arégénérative dans 44% des cas, une bicytopénie dans 35% des cas et une anémie isolée dans 21% des cas.

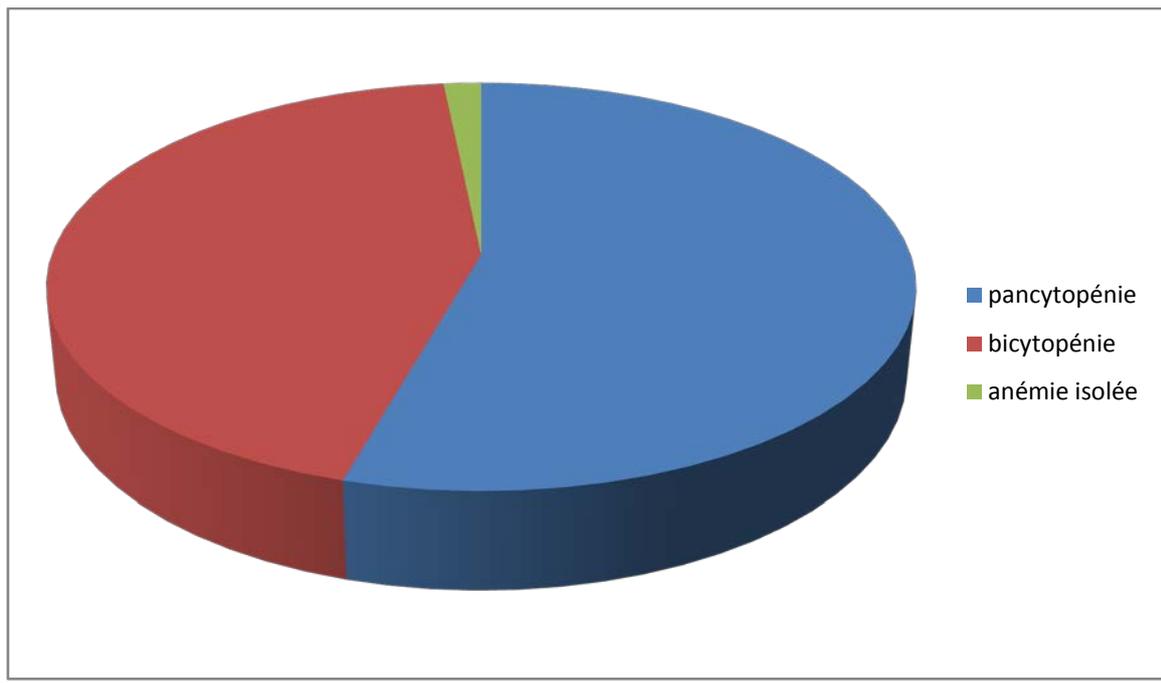


Figure 22 : Résultats de l'hémogramme chez nos patients

D-Examens de certitude :

Tous les patients ont présenté des signes cliniques et/ou biologiques compatibles avec le diagnostic de la leishmaniose viscérale, d'où la réalisation d'une sérologie avec au premier plan un test de diagnostic rapide permettant, comme son nom l'indique, d'orienter rapidement le diagnostic, dans l'attente d'autres investigations.

Il est à noter que TDR que nous avons utilisé comporte 2 lignes de test : T1 permettant de détecter les IgG anti-leishmaniens et T2 pour les IgM anti-leishmaniens.

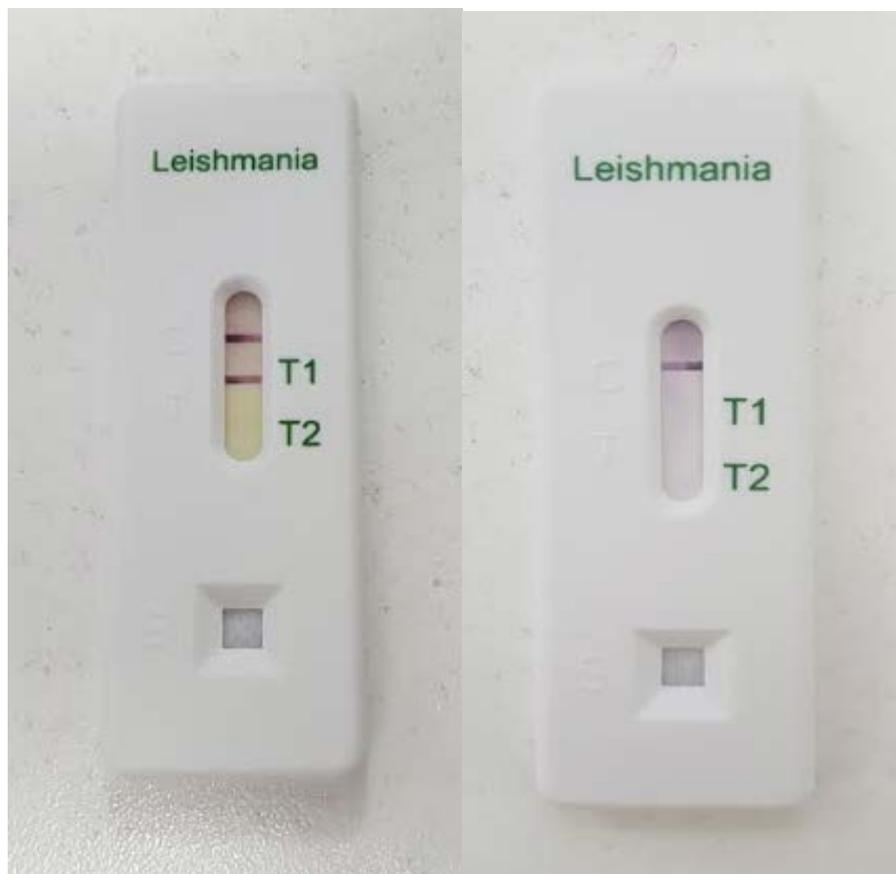


Image 1 : résultats des TDR « LeishmaniaIlgG/IgMrapid™ ». A gauche positif à IgG, à droite négatif (seule la bande de contrôle apparait)

En effet après réalisation du TDR, 96% des patients ont bénéficié ensuite d'une sérologie par ELISA afin de rechercher la présence d'anticorps anti-leishmania (ELISA n'a pas pu être réalisée dans les autres cas à cause d'un épuisement du kit). Dans

86,1% des cas, les résultats du test rapide et ceux de l'ELISA étaient concordants : les tests étaient tous les deux positifs pour 19 échantillons et négatifs chez 43 autres patients. En revanche dans 13,9% des cas, les résultats des deux tests étaient différents avec un test rapide positif et une ELISA négative chez 9 patients, et l'inverse a été retrouvé chez un seul patient. Dans ces cas de discordance entre les résultats du test rapide et celui de l'ELISA, on a parfois eu recours au Western Blot afin de trancher sur le résultat de la sérologie en attendant la réalisation du médullogramme.

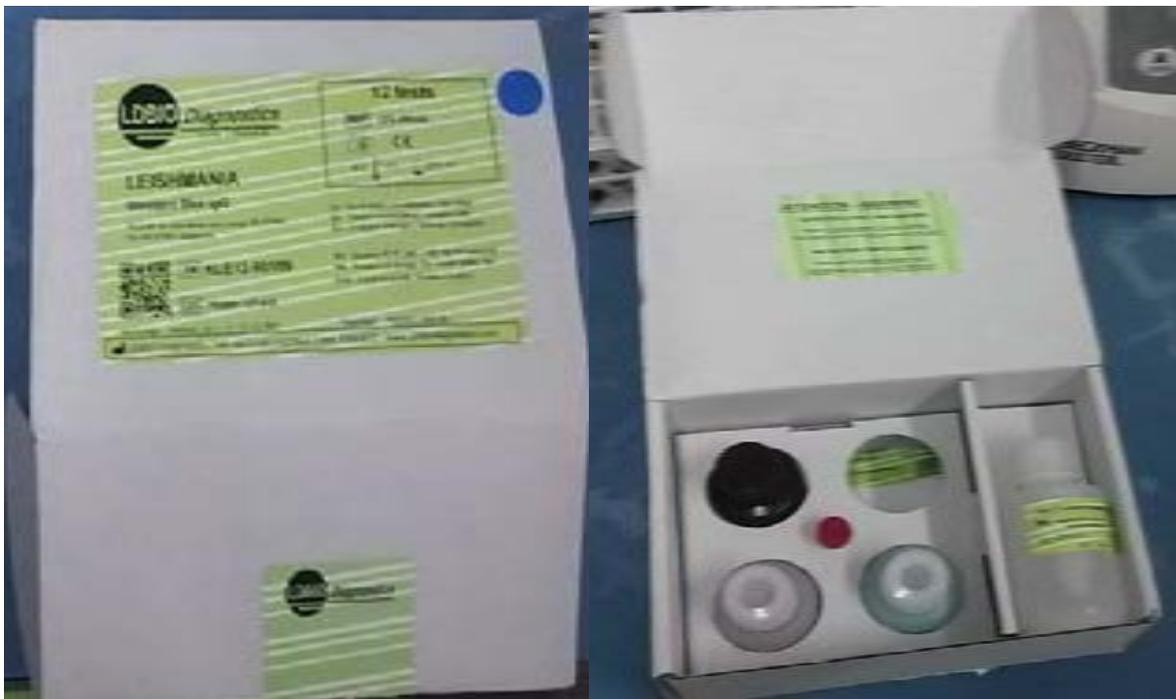


Image 2: Kit de WB utilisé dans notre laboratoire

66,6% des patients ont bénéficié d'un médullogramme permettant de confirmer ou non le diagnostic par la recherche de corps de leishmanies sur le frottis médullaire. Pour le reste, il s'agit de patients présentant une sérologie de leishmaniose négative et chez qui le reste des investigations paracliniques a permis

de mettre en évidence d'autres diagnostics, et éloigner ainsi celui de la leishmaniose.

En effet, chez les patients ayant bénéficié d'un médullogramme, le frottis de la moelle osseuse coloré au May Grunwald Giemsa a permis de mettre en évidence la présence de corps de leishmanies sous formes amastigotes dans 98,6% des cas présentant une sérologie positive. Dans un seul cas, le médullogramme n'a pas objectivé la présence de corps de leishmanies à cause de la forte hémodilution du prélèvement. Le diagnostic a été retenu uniquement sur les arguments épidémioclinique et sérologique. L'amélioration clinique et biologique après instauration du traitement était en faveur du diagnostic.

Dans un autre cas, le TDR était négatif mais la lecture du frottis médullaire a retrouvé la présence de plusieurs corps de leishmanies intra et extramacrophagiques. Les renseignements cliniques collectés chez ce patient ont objectivé la présence d'un déficit immunitaire primitif expliquant ces résultats sérologiques.

Finalement dans un dernier cas, les résultats du TDR et ceux d'ELISA étaient négatifs, le médullogramme n'a pas objectivé de corps de leishmanies mais le Western Blot a retrouvé la présence d'une bande de 16KdA. Il s'agit d'un enfant de 2ans ayant comme antécédents des crises convulsives à répétition pour lesquelles il a été mis sous traitement, et admis pour ictère. L'examen clinique avait retrouvé un ictère fébrile et une hépatosplénomégalie homogène. Le bilan biologique a montré une pancytopénie arégénérative et une VS accélérée, et le reste des investigations n'a pas permis d'objectiver l'étiologie en cause. Devant l'impasse diagnostic et la présence d'arguments clinico-biologique en faveur de la leishmaniose, une confirmation par WB a été demandée et est revenue positive. Cependant, aucune

cause d'immunodépression expliquant cette discordance sérologique n'a été décelée chez ce malade.

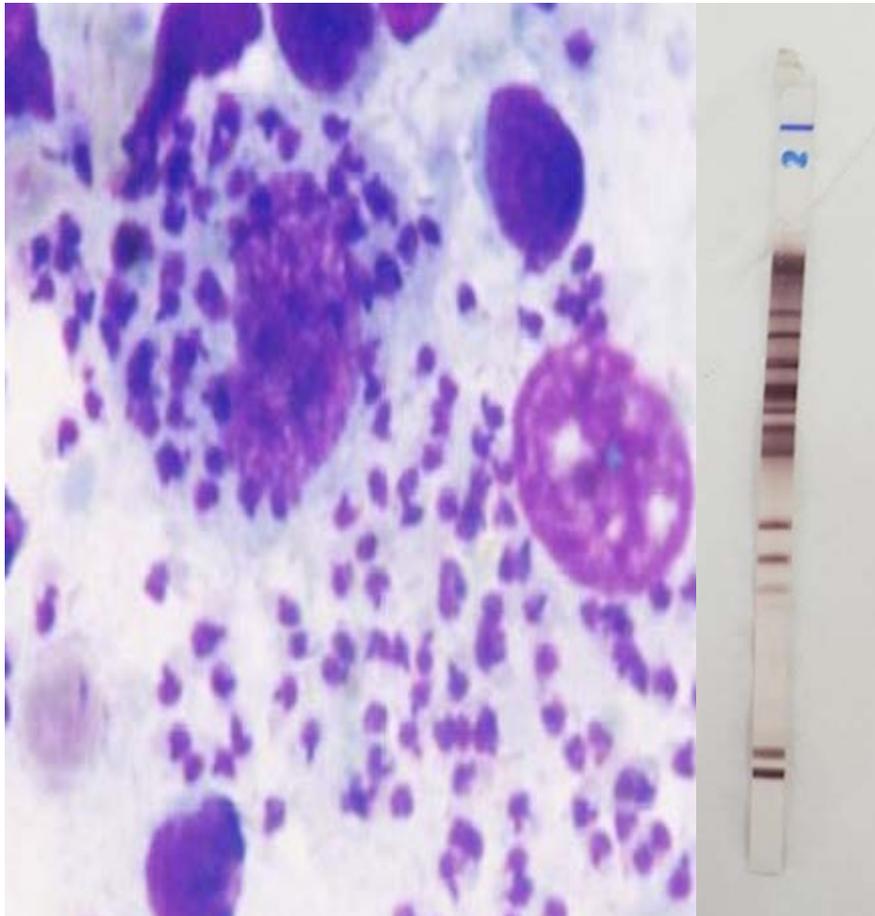


Image 3 : A gauche : présence de nombreux corps de leishmanies sous forme amastigote en intra et extra-cellulaire. A droite : WB+ présence de bandes 14 et 16KDA

Tableau 2 : Résultats du test immunochromatographique rK39 dans notre série

	Leishmaniose viscérale (+)	Leishmaniose viscérale (-)
ICT rK39 positif	39	0
ICT rK39 négatif	2	66

Tableau 3 : résultats du test immunochromatographique rK39 et de l'ELISA dans le diagnostic de la leishmaniose dans notre étude

ICT Elisa rK39 \	Positive	Négative
Positif	30	9
Négatif	1	67

Tableau 4: valeur intrinsèque des examens évalués dans notre série

	Sensibilité	Spécificité
Test rapide	95.1%	100%
Elisa	75.6%	85,5%
Médullogramme	95.1%	100%

III-DISCUSSION

A-Performances du test rapide :

1-Sensibilité et spécificité :

Les performances du test rapide sont évaluées par les valeurs intrinsèques représentées par la sensibilité et la spécificité.

Ainsi, la sensibilité est définie comme étant la capacité du test à détecter les patients atteints de leishmaniose viscérale et éliminer ainsi les faux négatifs (FN), c'est-à-dire les patients malades que le test n'a pas pu identifier. La spécificité par contre, est la capacité du test à détecter des sujets non atteints de leishmaniose viscérale éliminant ainsi les faux positifs (FP).

Dans notre étude, le test rapide est revenu positif chez 96.4% des patients présentant une leishmaniose viscérale, et négatif chez tous les patients ne présentant pas la maladie. La sensibilité est donc à 96.4% et la spécificité à 100%. En autre terme, il y a un seul faux négatif et aucun faux positif.

Concernant la sensibilité, nos résultats se rapprochent de ceux retrouvés en Suisse [20] et en Bangladech [36], où le taux de sensibilité a été respectivement de 97 et 95%. Aussi, dans une étude prospective réalisée au CHU Ibn Sina de Rabat concernant 49 patients hospitalisés pour suspicion de leishmaniose viscérale, la sensibilité du rk39 était de 96.3% supérieure à celle de l'IFI (92.59%) et celle de l'ELISA (85.19%) [37].

En revanche, des taux moins élevés ont été notés en France du sud et en Brésil [38](avec respectivement 91,8 et 85,7%), et les meilleurs résultats ont été notés en Inde par S.Sundar [39] où la sensibilité a atteint le taux de 100%.

La spécificité du test rapide rk39 a été chiffrée dans la présente étude à 100%. Ces mêmes résultats ont été retrouvés dans plusieurs études en Brésil, en Iran, en Italie et en Inde[38,39]. C'est-à-dire que sur 100 sujets réellement négatifs, le test rapide a été capable de confirmer tous les sujets sans faux positifs. En revanche, la spécificité retrouvée en Inde a été de 95%. Ce taux a tout de même été considéré suffisant lorsque la définition des cas suspects (plus de 2 semaines de fièvre et splénomégalie) est respectée [20].

2-Choix de l'antigène :

Une méta-analyse a été menée par l'OMS afin d'évaluer les tests de diagnostic rapide pour la leishmaniose viscérale. L'étude a été réalisée au niveau de trois régions endémiques pour la leishmaniose (Afrique de l'Est, Brésil et Subcontinent Indien), et a utilisé deux antigènes rK39 et rKE16 [40].

La spécificité du test de diagnostic rapide pour les deux antigènes a dépassé les 90% dans les trois régions endémiques.

Dans le Sous-continent Indien, le taux de sensibilité pour les deux antigènes a été plus élevé que dans les autres régions et a varié de 92.8% à 100% [40].

En Afrique de l'Est et au Brésil, les taux de sensibilité les plus faibles ont été notés pour l'Ag rKE16 (respectivement 36.8 et 61.5%). Ce résultat a été expliqué par l'utilisation de l'Ag rKE16 dérivé de *Leishmaniadonovanide* l'Inde [40].

L'étude a conclu finalement que les performances du TDR dépendent du choix du réactif utilisé qui doit prendre en considération les différentes souches circulantes dans chaque région [40].

Tableau 5 : Résultats de la méta-analyse menée par l'OMS évaluant le TDR de leishmaniose avec différents antigènes dans 3 continents [40]

Produit	Afrique de l'Est		Brésil		Subcontinent indien	
	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité	Sensibilité	Spécificité
Crystal KA	36.8%	98.0%	61.5%	98.4%	92.8%	99.2%
DiaMed-IT LEISH	87.2%	96.4%	92.0%	95.6%	98.8%	97.6%
KalazarDetect	67.6%	90.8%	84.7%	96.8%	99.6%	96.0%
Signal-KA	73.2%	96.4%	79.2%	98.8%	100%	100%
Onsite Leishmania Ab Rapid					99.6%	96.8%

Tableau 6 : Les Ag utilisés dans la méta-analyse de l'OMS [40]

Réactif	Fabricant	Format	Antigène
CrystalKA	Span Diagnostics	Bandelette	rKE16
DiaMed- IT Leish	Bio-Rad	Cassette	rK39
KalazarDetect	InBios	Bandelette	rK39
Signal KA	Span Diagnostics	Cassette	rKE16
OnSiteLeishmaniaAb rapid Test	CTK Biotech	Bandelette	rK39

B-Limites:

Dans notre étude, un des TDR de leishmaniose était négatif malgré la présence de corps de leishmanies évidents au niveau de la moelle. Ce résultat était retrouvé chez un patient présentant comme cause d'immunodépression un déficit immunitaire primitif. Les données de littérature ayant traité l'efficacité des TDR de leishmaniose en présence d'une immunodépression ont rapporté essentiellement les cas de co-infections VIH-leishmaniose [20,27]. Les autres causes d'immunodépression rapportées sont représentées par les hémopathies, les greffes d'organes, le lupus et les causes iatrogènes (corticothérapie et immunosuppresseurs).

En effet, chez les patients VIH+, la leishmaniose viscérale est considérée comme une infection opportuniste et *L.infantum* est l'espèce le plus souvent incriminée, faisant évoquer en plus du mode de transmission habituelle de leishmaniose, la contamination par les seringues souillées chez les toxicomanes [41]. La parasitose survient à un stade d'immunodépression avancé généralement quand le taux de CD4 est inférieur à 200/ μ l [11], et la tranche d'âge la plus touchée se situe entre 30 et 50 ans.

Dans une étude menée en Suisse sur des patients séropositifs pour le VIH, la sensibilité de l'ID-PaGIA® a été de 71%, et celle de l'IT-Leish® plus faible avec un taux de 54% (tableau 8) [27]. L'étude a conclu que les TDR, étant une méthode sérologique basée sur la détection d'anticorps, ne doivent pas être utilisés chez les patients immunodéprimés.

Tableau 7 : sensibilité et spécificité de 2 TDR utilisant l'Ag rK39 : IT-Leish® et ID-PaGIA® chez les patients non séropositifs en Suisse [27]

Patients non VIH	Sensibilité	Spécificité
IT-Leish®	97%	98%
ID-PaGIA®	97%	94%

Tableau 8 : sensibilité et spécificité des 2 TDR : IT-Leish® et ID-PaGIA® chez les patients VIH+ en Suisse [27]

Patients VIH+	Sensibilité	Spécificité
IT-Leish®	54%	98%
ID-PaGIA®	71%	94%

Le TDR de leishmaniose ne peut être utilisé seul dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale. Un résultat négatif n'exclut absolument pas la présence d'une leishmaniose viscérale. Si le contexte épidémiologique et/ou clinique est en faveur, les autres investigations précédemment citées seront nécessaires.

Aussi, le TDR de leishmaniose étant un test qualitatif, ni le taux quantitatif ni la cinétique des anticorps ne peuvent être déterminés.

Enfin, en cas de suspicion de rechute d'une leishmaniose viscérale, le TDR n'a aucun intérêt car les anticorps persistent jusqu'à 24 mois après succès thérapeutique [20,40].

CONCLUSION

La leishmaniose viscérale est un problème de santé publique au Maroc et notamment dans la région de Fès où elle constitue un foyer endémique par excellence.

Les données épidémiologique et la gravité de la maladie ont fait de la leishmaniose une des préoccupations majeures de l'OMS à côté de du paludisme, du VIH et de la tuberculose. Un programme de lutte prioritaire a été mis en place, ayant pour objectif le diagnostic précoce de la maladie, la prise en charge rapide ainsi que la lutte contre les réservoirs hôtes et les phlébotomes.

Dans ce contexte, les tests de diagnostic rapides constituent une innovation importante en matière du diagnostic, permettant ainsi un diagnostic rapide, simple, et peu coûteux. A cela s'ajoute la facilité de conservation, d'utilisation et d'interprétation.

Grâce à ces avantages, les TDR permettent non seulement un délai bref de diagnostic, essentiellement dans un contexte d'urgence ou d'épidémie, mais contribuent également à une meilleure prise en charge et une réduction du coût due à une diminution de la période d'hospitalisation.

Ces tests peuvent être proposés en première intention devant des tableaux cliniques évocateurs en raison des excellents résultats obtenus aussi bien dans la littérature que dans notre étude réalisée en zone d'endémie.

RESUME

INTRODUCTION :La leishmaniose viscérale est une infection parasitaire à transmission vectorielle causée par un parasite du genre *Leishmania*. Cette maladie, plus fréquente chez l'enfant que chez l'adulte, connaît depuis plusieurs années déjà une forte recrudescence dans la région de Fès. Le médullogramme représente sans doute la clé du diagnostic de certitude, mais les autres examens s'avèrent souvent utiles et peuvent contribuer également au diagnostic.

OBJECTIF :Dans cette étude, nous mettons le point sur l'intérêt des tests rapides (TDR) dans le diagnostic de la leishmaniose. Nous évaluons les performances tout en les comparant aux autres tests diagnostiques : l'examen direct, ELISA et WESTERN BLOT.

MATERIEL ET METHODES : Il s'agit d'une étude rétrospective portant sur 107 patients chez qui une leishmaniose viscérale a été suspectée et qui ont bénéficié d'un test de diagnostic rapide ainsi que d'autres examens permettant de confirmer ou non la présence de cette pathologie : ELISA, Western Blot, médullogramme.

Le diagnostic a été effectué au sein du service de Parasitologie–Mycologie du CHU Hassan II de Fès. Nous avons utilisé comme TDR le « *Leishmania* IgG/IgMRapid™ » utilisant l'Ag rK39. Les renseignements cliniques ainsi que le reste du bilan biologiques ont été collectés à partir des dossiers des malades hospitalisés dans les différents services du centre hospitalier.

RESULTATS : Dans une région potentiellement endémique comme la nôtre, les résultats retrouvés ont été très satisfaisants : la sensibilité a été chiffrée à 95.1% et la spécificité a atteint les 100%.

DISCUSSION ET CONCLUSION : Ces résultats, tout comme ceux de la plupart des autres études, ont fait des TDR de Leishmaniose une importante innovation dans le diagnostic de la Leishmaniose viscérale.

Les différents avantages que présentent ces tests (rapidité, simplicité, coût et performances) devraient nous amener à les utiliser non seulement en cas d'urgence ou de non accessibilité des autres examens, mais également dans les laboratoires spécialisés à côté des autres examens de confirmation.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] **AMRANI HASSANI M et al.** Aspects biologiques de la leishmaniose viscérale infantile à propos de 31 cas diagnostiqués sur 10 mois au laboratoire d'hématologie du CHU Hassan II de Fès (Maroc). Revue francophone des laboratoires – février 2011 – n°429 // 59.
- [2] **MARTY P.** Leishmaniose viscérale: épidémiologie, diagnostic et traitement. La Lettre de l'Infectiologue 2010 ,tome XXV – n°5: 186–190.
- [3] **FAUCHER B, PIARROUX R.** Actualités sur les leishmanioses viscérales. La Revue de médecine interne 2011 ; 32 : 544–551.
- [4] **DEDET JP.** Leishmanies, leishmanioses :Biologie clinique et thérapeutique. Encycl. Méd. Chir. Maladies infectieuses2009 ; 8 :11.
- [5] **LAKHDAR IDRISSE M, EL OUARDI M, ATMANI S, et al.** La leishmaniose viscérale infantile : à propos de 209 cas. J PédPuéricult 2007;20:136–41.
- [6] **EL BAROUDI H.** Ecoépidémiologie de la leishmaniose viscérale au Maroc. Thèse pour l'obtention du doctorat en pharmacie. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. N26/2014.
- [7] **AGOUMI A et al.** Leishmanioses. Précis de parasitologie médicale, ouvrage, collection Médika. La référence médicale2003 ; 0048 :49–63.
- [8] **ROSENTHAL E, MARTY P.** Actualités sur la leishmaniose viscérale méditerranéenne. RevMéd Int 2009;30:S24–8

- [9] **DEDET JP.** Leishmanies, leishmanioses. Biologie, clinique et thérapeutique. EncyclMédChir Maladies infectieuses 8-506-A-10 ;2001:11 p.
- [10] **Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte Contre les Maladies (D.E.L.M) :** Maroc en chiffre, 2006.
- [11] **CARRE N ET al.** La leishmaniose viscérale. Epidémiologie, diagnostic, traitement et prophylaxie. J Pharm Clin 2010.29(3) :121-48.
- [12] **SINGH R.K, PANDEY H.P, SUNDAR S.** Visceral leishmaniasis : challenges ahead. Indian J Med Res 123, March 2006, pp 331-344.
- [13] **TAMIMY H.** La leishmaniose viscérale infantile (A propos de 73 cas). Thèse de médecine, Faculté de médecine et de pharmacie de Fès 2011.
- [14] **IZRIA A, BELAZZOUGB S.** Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées en Algérie. Rev Fr Lab 2007 ;396bis:3-10.
- [15] **NAJMA S.** La leishmaniose viscérale (Epidémiologie et actualité thérapeutique).
Thèse
De pharmacie 2008 n°32 Rabat.
- [16] **BEN GHAZI M.** 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.

- [17] LIMONCU ME, BALCIOGLU IC, YERELI K, et al. A new experimental in vitro culture medium for cultivation of Leishmania species. J Clin Microbiol 2007 ;35(9):2430-1
- [18] LAHNECH C. La LV Infantile à l'Hôpital SaniatRmal de Tetouan à propos de 50 cas (2000-2006). Thèse de médecine 2006 n°392 Rabat
- [19] Association française des Enseignants en Parasitologie. Parasitologie - Mycologie médicale, chapitre II Protozooses, Leishmanioses viscérales, Anofel, 7e édition, 4e trimestre 2002.
- [20] HOUZEA S, PARIS L. Apport des tests de diagnostic rapide en parasitologie : intérêt et limites. Revue francophone des laboratoires - juillet/août 2015 - n°474// 29.
- [21] EL GHAIIDI M. Apport du laboratoire au diagnostic de la leishmaniose viscérale. Expérience du service de Parasitologie de l'Hôpital Militaire Avicenne de Marrakech. Thèse N184.2016
- [22] SANTOS-GOMES G, GOMES-PEREIRA S, CAMPINO L et al. Performance of immunoblotting in diagnosis of visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus-Leishmania sp.-coinfecting patients. J Clin Microbiol 2000 ; 38 : 175-8.

- [23] ROMERO PEÑUELA M et al. Canine visceral leishmaniasis diagnosis by means of western blot and indirect immunofluorescence test. *Hacia la Promoción de la Salud*, Volumen 15, No.1, enero – junio 2010, págs. 55 – 62.
- [24] FLAMINIA PERSICHETTIM et al. Diagnostic performance of ELISA, IFAT and Western blot for the detection of anti-Leishmania infantum antibodies in cats using a Bayesian analysis without a gold standard. *Parasites & Vectors* 2017;10:119.
- [25] CHABASSE D. Tests de Diagnostic Rapide en biologie, applications en infectiologie. *Revue Francophone des Laboratoires*; 474(2015): 27–8.
- [26] CHAPPUIS F. A metaanalysis of the diagnostic performance of the direct agglutination test and rK39 dipstick for visceral leishmaniasis. *BMJ*. 2006; 333(7571):723–5
- [27] MARTY P, DELAUNAY P, FISSORE C, LE FICHOUX Y, La leishmaniose méditerranéenne due à leishmania infantum mise au point – intérêts des tests de diagnostic rapide: IT-LEISH®* et ID-PAGIA LEISHMANIASIS®*. *Med Trop* 2007 ; 67 : 79–85
- [28] GALL H. College of American Pathologists Proposal for the Oversight of Laboratory-Developed Tests. *ArchPatholLab Med* 2011; 135 (11): 1432–35.
- [29] Ronat JB, GUEGUEN M. Les TDR des fièvres : principes, limites et perspectives. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* (2014) 107:204–209

- [30] Page AL. La validation des TDR sur le terrain : une étape difficile mais indispensable. Bull. Soc. Pathol. Exot. (2014) 107:204–209.
- [31] RANNOU E. Les tests rapides d'orientation diagnostique. Thèse diplôme d'état de Docteur en pharmacie. Université Claude Bernard–Lyon 1 2013.
- [32] SUNDAR S et al. (2003): Evaluation of a new rapid immunochromatographic diagnostic test (IT LEISH) for indian visceral leishmaniasis and PKDL. Abstract – ASTMH 52nd Annual Meeting, Philadelphia (USA).
- [33] ZAIT H, FERHANI Y, ACHIR I, HAMRIOUI B. Etude de 71 cas de leishmanioses viscérales diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009. Méd et Mal Infect 2012;42:119–125.
- [34] MINODIER P, GARNIER J.M. La Leishmaniose Viscérale Infantile En Provence. Archpediatr 2000;7,3:572–577.
- [35] ZOUGAGHI L, MOUTAJ R, CHABAA L, AGOUMI A. Leishmaniose viscérale infantile : profil épidémiologique, clinique et biologique. À propos de 93 cas. Archpediatr 2009 ;16:1513–1518.
- [36] KHAN MGM et al. Evaluation of rK-39 strip test using urine for diagnosis of visceral leishmaniasis in an endemic area in Bangladesh. Parasites & Vectors 2010, 3:114.

- [37] **MNIOUIL M.** Comparative evaluation of immunochromatographic dipstick test (ICT) rk39, soluble antigen ELISA and IFAT for the sero-diagnosis of visceral leishmaniasis in Morocco. *ActaTropica* volume 182, June 2018, Pages 185–189.
- [38] **MOLINET FJL, AMPUERO JS, COSTA RD, NORONHA EF, ROMEO GAS.** Specificity of the rapid rK39 antigen-based immunochromatographic test Kalazar Detect(r) in patients with visceral leishmaniasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2013 May; 108(3): 293–296.
- [39] **SUNDAR S et al.** 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.
- [40] **CUNNINGHAM J et al.** A global comparative evaluation of commercial immunochromatographic rapid diagnostic tests for visceral leishmaniasis. *CID* 2012;55:1312–9.
- [41] **RAPP C, ROUE R.** Leishmaniose. Edition scientifique et médicale 2001, 4–1310.