

# Leishmaniose canine à *Leishmania infantum* : intérêt et réalisation du test au latex. Applications en éco-épidémiologie.

J. Dereure (1), G. Lanotte (1), F. Pratlong (1), J. Gouvernet (2), J. Majhour (3), S. Belazzoug (4),  
A. Khiami (5), H. A. Ragueh (6), D. Jarry (1), J. Périères (1), & J.-A. Rioux (1)

(1) Laboratoire d'écologie médicale et de pathologie parasitaire, Faculté de médecine, 163 rue Auguste Broussonet, 34090 Montpellier, France.

(2) Service de l'information médicale, CHRU de Marseille, France.

(3) Direction de l'épidémiologie et des programmes sanitaires, Rabat, Maroc.

(4) Laboratoire d'analyses médicales, Bou Ismail, Tipaza, Algérie.

(5) Hôpital Mouassat, Laboratoire central, Université de Damas, Syrie.

(6) Hôpital républicain de Taéz, République arabe du Yémen.

Manuscrit N° 1935. "Parasitologie". Accepté le 15 juillet 1998.

**Summary:** Canine Leishmaniasis Due to *Leishmania infantum*: Interest and Realisation of the Latex Test. Ecoepidemiological Applications.

**Key-words:** Latex agglutination test -  
Leishmaniasis -  
*Leishmania infantum* -  
Dog - Eco-epidemiology -  
Algeria - Morocco -  
Syria - Yemen - France -  
Africa - Asia - Europe

The authors relate the realization, evaluation and eco-epidemiological applications of a "field-test": the agglutination of latex particles coated with a soluble antigen of *Leishmania infantum* in the presence of homologous antibodies. Evaluated on 1 035 canine sera, the sensitivity of the latex agglutination test (LAT) was 93.4% compared to the indirect fluorescent antibody test (IFAT). 90 node cultures were carried out on dogs with positive or negative LAT and/or positive or negative IFAT. The frequency of positive node cultures (70%) as versus positive LAT came between the results obtained for an IFAT >1/40 (64%) and IFAT >1/80 (73%). 32/33 (97%) dogs had positive node culture, LAT and IFAT (>1/80). 6 dogs had negative LAT but positive node culture: 5 of these had also an IFAT <1/160. This test was used in the field on several eco-epidemiological surveys in leishmanian enzootic areas. Node cultures were made on the dogs with positive TL. 39 strains were isolated: 18 in Algeria, 15 in Morocco, 2 in Syria and 4 in Yemen. 13/39 strains were obtained from dogs with IFI <1/160: 2 at 1/20, 8 at 1/40 and 3 at 1/80. In Algeria this test was also used for the diagnosis of human visceral leishmaniasis in a child. This quick, simple, sensitive and specific test could be usefully carried out on "field" surveys for the diagnosis of visceral-leishmaniasis in animals and human beings.

**Résumé :**

Les auteurs décrivent les modalités de réalisation, d'évaluation et d'applications éco-épidémiologiques d'un test de "terrain" : l'agglutination de particules de latex sensibilisées avec un antigène soluble de *Leishmania infantum*, en présence d'anticorps homologues. La sensibilité du test au latex (TL) par rapport à celle de l'immunofluorescence indirecte (IFI), évaluée sur 1 035 sérums canins, est de 93,4 %. La fréquence des positivités des cultures de ponctions ganglionnaires (PG), réalisées chez 90 chiens, par rapport aux résultats du test au latex (70 %) se situe entre les valeurs obtenues pour une immunofluorescence > au 1/40 (64 %) et celles pour une immunofluorescence > au 1/80 (73 %). 97 % des chiens (32/33) ayant une PG et un TL positifs ont également une IFI > au 1/80. Par contre, six chiens ayant un TL négatif ont une PG positive ; mais cinq de ceux-ci ont également une IFI inférieure au 1/160. Le TL ainsi validé a été utilisé à l'occasion de plusieurs missions éco-épidémiologiques en zone d'enzootie leishmanienne. Les chiens présentant une positivité au TL ont subi une PG. Trente-neuf souches ont été isolées : 18 en Algérie, 15 au Maroc, deux en Syrie et quatre au Yémen. Chez les 39 chiens positifs au TL et en PG, l'IFI était au 1/20 pour deux animaux, au 1/40 pour huit et au 1/80 pour trois autres. Le TL a également permis de porter un diagnostic de leishmaniose viscérale humaine chez un enfant d'Algérie. Cette technique simple, rapide, sensible et spécifique pourrait être utilisée à l'occasion d'enquêtes de "terrain" réalisées aussi bien chez l'animal que chez l'homme.

**Mots-clés :** Test au latex - Leishmaniose -  
*Leishmania infantum* -  
Chien - Eco-épidémiologie -  
Algérie - Maroc -  
Syrie - Yémen - France -  
Afrique - Asie - Europe

## Introduction

L'infection à *Leishmania infantum* est une amphixénose, c'est-à-dire une affection se développant par et chez deux ou plusieurs hôtes. Son complexe pathogène comporte : un hôte habituel, faisant office de réservoir, le chien, un vecteur, la femelle du phlébotome (insecte, Diptère). Dans le bassin méditerranéen occidental, le nombre de cas humains, autre-

fois relativement faible, s'est accru au cours de la dernière décennie. Cette augmentation est essentiellement liée à deux facteurs :

- l'immunodépression acquise à la suite de l'infection par le VIH ou induite par des thérapeutiques diverses dans les cas de transplantations d'organes ou de traitements corticoïdes au long cours.
- l'accroissement récent de la population canine, sous la dépendance de facteurs socioculturels.

Cette situation préoccupante conduit les autorités sanitaires à promouvoir des travaux visant à une meilleure connaissance de l'affection :

- dépistage sérologique afin d'évaluer l'enzootie canine,
- étude des souches circulantes par typage enzymatique pour déterminer l'identité du parasite.

La bonne corrélation établie entre les taux d'anticorps et la présence du parasite, mise en évidence par ponction ganglionnaire, permet de déterminer le niveau d'enzootie canine de l'affection sur les seuls critères sérologiques (18). Ceci conduit, au plan individuel, au dépistage des animaux atteints et, au plan général, à la détermination de la prévalence de l'affection.

Le diagnostic sérologique des leishmanioses canines fait classiquement appel à des techniques éprouvées depuis longtemps (immunofluorescence indirecte, électrosynérèse) ou plus récemment (ELISA). Celles-ci présentent toutefois l'inconvénient de nécessiter un matériel spécialisé et un temps de réalisation non négligeable. Or, pour l'épidémiologiste "de terrain", une technique immunologique simple à réaliser, rapide, sensible et spécifique est nécessaire aux enquêtes sérologiques. Le test au latex (TL), reposant sur l'agglutination de micro-particules de latex sensibilisées, nous a paru répondre à ces exigences. Dans les parasitoses humaines, un tel test a déjà été utilisé pour le diagnostic de l'amébose (1), de la distomatose (3), de l'hydatidose (5), de la toxoplasmose (15), de la trichinellose (6) et des trypanosomoses africaine (4, 7) et américaine (2, 16).

## Matériel et méthodes

### Echantillonnage canin et prélèvements

Le test au latex a été éprouvé vis-à-vis de 1035 sérums de chiens tout venant (de chasse, garde, bergers ou de compagnie) provenant de 47 communes du département des Pyrénées-Orientales, dans le sud de la France. Ces villages s'échelonnent entre 250 et 850 m d'altitude, dans la vallée du Conflent, orientée du sud-ouest au nord-est et drainée par un fleuve côtier : la Têt. Cette région, située dans l'étage climatique sub-humide, est connue de longue date pour être une zone d'enzootie leishmanienne. Pour chaque chien, un prélèvement sanguin a été réalisé. Après centrifugation du sang, le sérum a été analysé selon la technique proposée.

### Test au latex

Le support est constitué par des microbilles de polystyrène (réf. 3102-56-4, Difco Lab.) de 0,81 µm de diamètre. Le tampon utilisé pour les lavages, les dilutions de sérum et de latex, est un tampon glycolle de composition suivante :

glycolle (réf. 4201, Lab. Merck)	7,5 g
H <sub>2</sub> O distillée	900 ml
NaCl	10 g

ajusté à pH 8,2 avec NaOH 1N. On complète à 1 000 ml avec de l'eau distillée. Afin de conserver la stérilité du tampon, il convient d'ajouter 0,1 g d'azide de sodium par litre.

L'antigène utilisé est un extrait soluble de la souche de référence *L. infantum* MHOM/FR/78/LEM 75, zymodème MON-1. Il est obtenu après culture en masse sur milieu NNN en boîtes de ROUX. Après lavage, les formes promastigotes sont conservées à - 80 ° C, sous forme de perles de 100 µl, obtenues par projection dans l'azote liquide. Pour obtenir l'antigène soluble, les perles sont décongelées en présence d'un volume d'eau distillée égal à la moitié du volume total des perles utilisées. Sept

séries d'ultrasonation, entrecoupées d'arrêts d'une minute, sont ensuite réalisées en bain de glace fondante afin d'éviter tout réchauffement préjudiciable à l'intégrité des protéines antigéniques. L'ultrasonation est centrifugé à 25 000 g à + 4 ° C pendant 20 minutes. Le surnageant (S1) est recueilli et conservé à + 4 ° C. Le culot est lavé en solution de Na Cl à 9 ‰, puis centrifugé à 1000 g pendant 5 minutes à + 4 ° C. Le culot de centrifugation est repris dans un volume d'eau distillée égal à la moitié de celui du premier temps du protocole. Après une congélation à - 30 ° C et une décongélation lente, à température ambiante, une nouvelle ultrasonation est réalisée selon les mêmes paramètres que la première. L'ultrasonation est conservé une nuit à + 4 ° C. Une centrifugation à 25 000 g pendant 20 minutes à + 4 ° C permet de recueillir le surnageant (S2) qui est mélangé au premier (S1). La concentration protéinique du produit final doit être voisine de 1 mg/ml.

Les particules de latex sont sensibilisées après détermination du volume de latex à utiliser (1 volume de latex pour 5 volumes de la solution antigénique, titrant 1mg/ml). La suspension de latex est centrifugée à 1000 g pendant 10 minutes. Le culot constitué par les particules de latex est homogénéisé dans la solution antigénique et mis à incuber au bain-marie à 37° C pendant une heure, avec agitation intermittente. Une nouvelle centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes est effectuée. Le surnageant, constitué par l'antigène soluble non fixé, est rejeté. Le culot est lavé en tampon glycolle (pH 8,2). Après centrifugation à 1000 g pendant 10 minutes, le culot final est homogénéisé dans un volume de tampon glycolle (pH 8,2) égal au double de celui de la suspension de latex initiale. On ajoutera 0,1g d'albumine bovine par litre, afin de saturer les sites des microbilles non revêtus d'antigène. La suspension ainsi obtenue pourra être conservée 12 mois à + 4 ° C.

Pour réaliser le test, 10 µl de latex sensibilisé et un même volume de sérum à étudier, dilué au 1/5 dans le tampon glycolle, sont déposés sur une plaque de verre à fond noir et mélangés à l'aide d'un agitateur à usage unique. Une réaction positive se traduit, après rotation lente de la lame, par une agglutination des particules de latex, visible à l'oeil nu, dans un temps n'excédant pas cinq minutes. Un témoin positif et un témoin négatif sont systématiquement utilisés dans chacune des séries de réactions.

Le reliquat de sérum, additionné de merthiolate et conservé à + 4 ° C, a été rapporté au laboratoire pour être testé par la technique d'immunofluorescence indirecte (IFI), puis congelé. Un résultat douteux au test au latex a été considéré comme négatif.

Les animaux, présentant un résultat positif à au moins une des réactions (IFI ou TL), ont été revus le mois suivant. Pour chacun d'eux, un nouveau prélèvement sanguin et une adénoculture ont été effectués, afin de contrôler la sensibilité du test proposé.

### Réaction d'immunofluorescence indirecte

L'antigène utilisé est constitué par les formes promastigotes de la souche de référence décrite précédemment pour la préparation de l'antigène soluble. La concentration est de 2 millions par millilitre dans du sérum physiologique à 9 ‰. Huit dilutions (du 1/20 au 1/2560) de chacun des sérums à tester ont été effectuées. Après incubation à 37° C en chambre humide et lavage en tampon PBS (pH 7,2), une anti-immunoglobuline anti-chien (réf. BI 1104, Lab. Biosys) a été utilisée. Après incubation à 37° C et lavage en tampon PBS pH 7,2, les lames ont été lues au microscope à lampe à vapeur de mercure. Le titre-seuil du 1/160 a été retenu. Il convient toutefois de remar-

quer que ce seuil, valable pour un échantillon de population, ne l'est plus au plan individuel. En effet, un titre plus faible peut correspondre à une affection débutante ou infra-clinique.

## Etude statistique

La concordance entre le test au latex et l'immunofluorescence a été étudiée au plan statistique par le calcul du coefficient Kappa (8). Plus sa valeur se rapproche de 1, meilleure est la concordance.

## Ponction ganglionnaire

La ponction ganglionnaire a été réalisée au niveau du ganglion poplité, du fait de son accessibilité en situation sous-cutanée, selon le protocole décrit par LANOTTE et coll. (19). Le matériel recueilli a été ensemencé stérilement en milieu de culture NNN maintenu à + 24-26 ° C.

## Résultats

### Sérologies

Sur les 1035 sérums de chiens contrôlés, 61 sont positifs au titre-seuil du 1/160 en IFI, et 67 le sont également au TL (tableau I). Les fréquences respectives de positivité par rapport aux animaux examinés (5,9 % et 6,4 %) sont conformes aux valeurs habituellement retrouvées en zone d'enzootie leishmanienne (17). L'IFI est inférieure au titre-seuil de 1/160 pour 974 chiens (94,1 %) et 968 (93,5 %) sont négatifs au TL.

Tableau I.

Infection canine à <i>Leishmania infantum</i> dans le sud de la France (région du Conflent, Pyrénées-Orientales). Comparaison des résultats des immunofluorescences indirectes (IFI) et des tests au latex (TL) réalisés sur 1 035 sérums . <i>Canine Leishmania infantum infection in southern France (region of Conflent, Pyrénées-Orientales). Comparison of results of indirect immunofluorescences (IFI) and latex tests (LT) carried out on 1035 sera.</i>									
IFI	<1/20	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560
TL +	3	0	0	7	17	9	12	8	11
TL -	828	72	52	12	3	1	0	0	0
total	831	72	52	19	20	10	12	8	11
% TL +	0,36	0	0	37	85	90	100	100	100

Nous constatons que 61 sérums (5,9 %) sont positifs en IFI au titre seuil du 1/160 et 67 (6,4 %) au TL. La sensibilité du TL par rapport à l'IFI (seuil 1/160) est de 57/61, soit 93,4 %. Sa spécificité est de 98,9 % (964 sérums inférieurs au titre seuil et négatifs au TL/974 sérums négatifs en IFI). La valeur du coefficient Kappa est égale à 0,883 ( $p < 10^{-6}$ ).

Les résultats des positivités du TL par rapport à l'IFI (tableau I) font apparaître une bonne sensibilité (rapport des sérums positifs en IFI au titre seuil et au TL sur le total des sérums positifs en IFI, soit 57/61, 93 %) et une bonne spécificité (rapports des sérums négatifs en IFI et au TL sur le total des sérums négatifs en IFI, soit 964/974, 98,9 %). Les intervalles de confiance à 95 % sont respectivement de 83,2 %-97,9 % pour la sensibilité et 98,1 %-99,5 % pour la spécificité. La concordance entre les deux tests (TL et IFI >1/80), étudiée sur le plan statistique par le calcul du coefficient Kappa, fait apparaître une valeur égale à 0,883 ( $p < 10^{-6}$ ).

Trois chiens présentant une sérologie < au 1/20 en IFI sont positifs au TL, ainsi que sept ayant une IFI au 1/80. Par contre, trois chiens ayant une IFI au 1/160 et un au 1/320 ont un TL négatif. Ces 14 animaux ont été contrôlés le mois suivant. Leur cas est discuté plus loin.

## Ponctions ganglionnaires

Quatre-vingt dix ponctions ganglionnaires (PG) ont été réalisées : cinq chez des chiens uniquement positifs au TL, trois chez des chiens pour lesquels seule l'IFI était positive au seuil

du 1/160 et 42 chez des chiens positifs aux deux réactions. Quarante chiens négatifs aux deux réactions ont subi une PG à titre de contrôle. Trente-neuf PG sont positives (43,3 %) : 33 chez des chiens ayant un TL positif et six chez des chiens ayant un TL négatif (tableau II c). Trente-neuf PG sont également positives (43,3 %) chez 33 chiens ayant une IFI positive au seuil du 1/160 (huit au 1/160, cinq au 1/320, six au 1/640, sept au 1/1280 et sept au 1/2560) et chez six chiens ayant une IFI < 1/160 (un au 1/40 et cinq au 1/80) (tableau II b). Trente deux chiens sur 33 ayant une ponction ganglionnaire positive et un TL positif ont une IFI positive au titre-seuil retenu. Un chien (C 602) a une PG positive avec un TL positif et une IFI au 1/80. Un autre chien (C 834) a également une PG positive, alors que son TL est négatif et son IFI est égale au 1/160. Cinq des six chiens qui ont une PG positive et un TL négatif ont également une IFI inférieure au titre seuil (un au 1/40 et quatre au 1/80). Le chien ayant une PG positive et un TL négatif est celui qui a une IFI positive au 1/160 (C 834), et celui ayant une PG positive et une IFI au 1/80 est celui ayant un TL positif (C 602).

Cinquante et une PG sont négatives : 37 chez des chiens ayant un TL négatif (dont 35 ont une IFI < 1/160) et 14 chez des chiens ayant un TL positif (10 de ceux-ci ayant également une IFI supérieure au titre seuil du 1/160).

Pour 47 chiens ayant un TL positif, 33 (70 %) ont une PG positive (tableau II c). Cette fréquence se situe entre les valeurs des PG positives obtenues pour une IFI positive au seuil du 1/160 (73 %, tableau II b) et une IFI au seuil du 1/80 (64 %, tableau II a). Ces valeurs sont conformes à celles qui ont été constatées par d'autres auteurs (17). De plus, une seule ponction ganglionnaire effectuée chez un chien sérologiquement positif n'apporte la confirmation parasitologique que dans 63 + 3 % des cas. Une deuxième et une troisième ponction permettent d'obtenir des valeurs respectives de 86 + 5 % et 94 + 4 % de positivité (17). Enfin, six ponctions ganglionnaires sont positives et 39 négatives chez 45 chiens ayant une IFI < 1/160, de même que six sont positives et 37 négatives chez les 43 chiens ayant un TL négatif.

Tableau II.

Infection canine à <i>Leishmania infantum</i> dans le sud de la France (région du Conflent, Pyrénées-Orientales). Résultats comparés des ponctions ganglionnaires (PG), des immunofluorescences indirectes (IFI) et des tests au latex (TL), réalisées chez 90 chiens. La fréquence des positivités des PG par rapport aux résultats du test au latex (II c) se situe entre les valeurs obtenues pour une IFI aux seuils respectifs du 1/80 (II a) et du 1/160 (II b). De même, la valeur du coefficient Kappa est intermédiaire à celles obtenues pour des IFI aux mêmes seuils. <i>Canine Leishmania infantum infection in southern France (region of Conflent, Pyrénées-Orientales). Comparison of results of node cultures (PG), indirect immunofluorescences (IFI) and latex tests (LT) carried out on 90 dogs.</i>			
II a.			
	IFI +	IFI -	total
PG +	38	1	39
PG -	21	30	51
total	59	31	90
% PG +	64	3	
Kappa= 0,531 ( $p < 10^{-3}$ ).			
II b.			
	IFI +	IFI -	total
PG +	33	6	39
PG -	12	39	51
total	45	45	90
% PG +	73	13	
Kappa= 0,6 ( $p < 10^{-3}$ ).			
II c.			
	TL +	TL -	total
PG +	33	6	39
PG -	14	37	51
total	47	43	90
% PG +	70	14	
Kappa= 0,558 ( $p < 10^{-3}$ ).			

## Discussion

### Sérologies

La sensibilité du test au latex par rapport à l'immunofluorescence indirecte (93,4 %) a des valeurs comparables à celles citées par d'autres auteurs, pour la technique d'agglutination directe (9, 10). Les résultats "faussement positifs" (10 / 974, soit 1,02 %) et "faussement négatifs" (4 / 61, soit 6,6 %) nécessitent quelques commentaires :

Dix chiens présentent un TL positif, alors que leur IFI est inférieure au titre-seuil (1/160) :

- C 762, C 810 et C 2005 ont une IFI < 1/20 et un TL positifs. Ces trois animaux n'ont pas été à nouveau présentés par leur propriétaire ;

- sept autres chiens présentent un titre en IFI au 1 / 80 et un TL positif :

- C 1228 et C 1456 n'ont pas été à nouveau présentés lors du contrôle ; l'un des deux (C 1456) avait été euthanasié sur conseil du vétérinaire, car il présentait une association de lésions caractéristiques de leishmaniose canine.

- C 602 et C 1271 ont présenté une ascension du titre en IFI à l'occasion du contrôle (respectivement 1/160 et 1/1280) ; les ponctions ganglionnaires étaient positive pour le premier et négative pour le second.

- C 45 et C 703 ont eu des résultats sérologiques en IFI identique lors du contrôle et des ponctions ganglionnaires négatives ; toutefois, chez le deuxième chien (C 703), le TL était négatif lors du contrôle.

- C 1270 dont la sérologie de contrôle montrait une régression en IFI (1/40) avaient un TL et une adénoculture négatifs. Dans les cas des chiens C 703 et C 1270, une éventuelle guérison spontanée pourrait expliquer ce phénomène. Ce fait a déjà été constaté à l'occasion d'autres enquêtes (23).

Les résultats concernant les chiens C 1456, C 602 et C 1271 pourraient donc être interprétés comme une sensibilité supérieure du test au latex par rapport à celle de l'immunofluorescence indirecte.

Par contre, quatre chiens ont présenté une négativité au TL et un titre en IFI égal ou supérieur au titre-seuil :

- C 2013 : n'a pas été à nouveau présenté par son propriétaire car euthanasié.

- C 834 : lors de l'examen initial, seule l'IFI était positive (1/160) ; à l'occasion du contrôle, TL, IFI et adénoculture étaient positifs.

- C 197 : le titre en IFI était stable lors du deuxième prélèvement (1/160) et l'adénoculture négative.

- C 2016 : à l'occasion du contrôle, le titre en IFI est passé du 1/160 au 1/80 et l'adénoculture était négative.

La négativité des adénocultures des chiens C 197 et C 2016 serait un argument favorable en faveur du test au latex. Le chien C 834 pourrait avoir présenté, quant à lui, un retard de positivité du TL par rapport à l'IFI. Les résultats faussement négatifs du TL pourraient être imputables à une cinétique des anticorps différente de ceux répondant en IFI, dans ce type de réaction, ou à un éventuel phénomène de zone.

### Ponctions ganglionnaires

Les résultats synthétiques (figure 1) font apparaître une bonne superposition des résultats des tests sérologiques comparés à la mise en évidence du parasite par ponction ganglionnaire : la même fréquence (36,7 %) est retrouvée par rapport à l'ensemble des chiens ponctionnés (n = 90) pour les chiens ayant

à la fois une PG positive et un TL positif (n = 33) ou ceux ayant une PG positive et une IFI positive au titre seuil du 1/160 (n = 33). De même, une fréquence identique (84,6 %) est observée pour les chiens ayant une PG positive et un TL positif (n = 33) par rapport à l'ensemble des PG positives (n = 39) que pour ceux ayant également une PG positive et une IFI positive au titre seuil du 1/160 (n = 33). Sur les 33 PG positives chez les chiens présentant un TL positif, 32 sont communes avec des chiens ayant également une IFI > 1/80. Sur les 14 ponctions négatives chez des chiens positifs au TL, 10 concernent aussi des animaux présentant une IFI > 1/80. Nous avons vu que ces résultats peuvent s'interpréter par le fait qu'une seule ponction ganglionnaire ne peut apporter une confirmation parasitologique dans 100 % des cas.

Sur les 37 ponctions ganglionnaires négatives chez les chiens qui présentent un TL négatif, 35 sont également communes avec des animaux ayant une IFI < au 1 / 160.

Par contre, les ponctions ganglionnaires positives chez six chiens ayant des sérologies < au 1/160 en IFI et chez six autres négatifs au TL posent le problème de la détermination du seuil de spécificité de la technique d'IFI et de la sensibilité du TL.

Il convient toutefois de signaler que cinq de ces six ponctions ganglionnaires concernent des chiens présentant à la fois une IFI < 1/160 et un TL négatif.

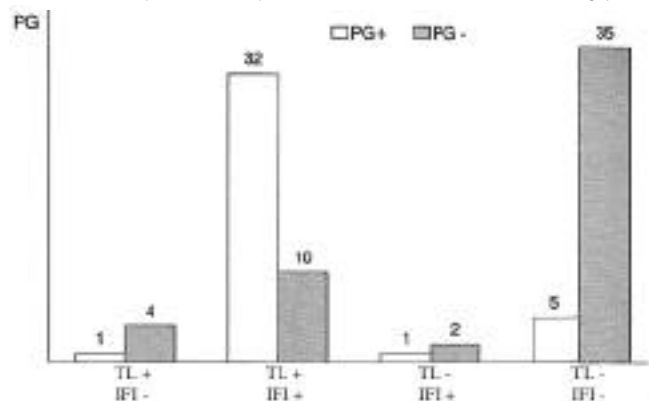
Figure 1.

Infection canine à *Leishmania infantum* dans le sud de la France (région du Conflent, Pyrénées-Orientales).

Résultats comparés des ponctions ganglionnaires (PG), des immunofluorescences indirectes (IFI) et des tests au latex (TL).

Canine *Leishmania infantum* infection in southern France (region of Conflent, Pyrénées-Orientales). Comparison of results of node cultures (PG), indirect immunofluorescences (IFI) and latex tests (LT)

Trente-neuf PG sont positives : 32 chez des chiens présentant une concordance positive du TL et de l'IFI et 5 chez des chiens ayant une sérologie négative au TL et en IFI. Par contre deux PG sont positives chez des chiens présentant une dissociation des résultats sérologiques. Cinquante et une PG sont négatives : 35 chez des chiens ayant une concordance négative du TL et de l'IFI ; 10 chez des chiens ayant des sérologies positives au TL et en IFI ; et six pour des chiens présentant une dissociation des résultats sérologiques.



## Applications

Le test au latex que nous avons ainsi évalué a été utilisé par nous-mêmes, au cours de la décennie écoulée, à l'occasion de nombreuses missions éco-épidémiologiques dans des foyers de leishmaniose à l'étranger. Le but proposé était d'identifier les chiens porteurs de *Leishmania* et d'isoler des souches canines dans le but de les identifier. Les animaux trouvés positifs au test au latex ont été soumis à des prélèvements de suc ganglionnaire par ponction du ganglion poplité. C'est ainsi que 39 souches de *Leishmania* d'origine canine ont pu être isolées dans plusieurs pays d'enzootie leishmanienne : Algérie, Maroc, Syrie et Yémen. Les souches isolées ont été ensuite typées par la technique isoenzymatique en gel épais d'amidon à l'aide de 15 systèmes enzymatiques (24).

## Algérie

Deux enquêtes éco-épidémiologiques ont été réalisées en décembre 1987 et août 1988, en coopération avec l'Institut Pasteur d'Alger, dans la région de Tizi-Ouzou, en Kabylie, dans l'étage climatique sub-humide où l'enzootie leishmanienne est connue de longue date. Nous avons pu isoler 18 souches de *L. infantum* provenant de chiens résidant habituellement en zone rurale (11) :

- trois chez des animaux présentant une positivité au TL et en IFI au titre-seuil du 1/ 160,
- 11 chez des chiens ayant un TL positif mais une IFI inférieure au titre-seuil (un au 1/ 20, sept au 1/ 40 et trois au 1/ 80),
- quatre obtenues après rétro-culture chez des hamsters inoculés avec du suc ganglionnaire prélevé chez des chiens présentant une positivité au TL et en IFI.

Toutes les souches isolées ont été identifiées comme appartenant au zymodème MON-1, à l'exception de deux d'entre elles (MON-77) chez des chiens présentant un TL positif et une IFI au 1/40.

Il est intéressant de noter qu'à l'occasion de cette enquête, nous avons pu porter, grâce au test au latex, un diagnostic de leishmaniose viscérale humaine chez un enfant âgé d'un an présentant un état fébrile, une pâleur importante et une splénomégalie. Après prélèvement sanguin, le TL a été réalisé sur le sérum obtenu après centrifugation et s'est avéré positif. Ce résultat a été confirmé par l'Institut Pasteur d'Alger (IFI : 1/ 640).

## Maroc

Plusieurs missions ont été réalisées, en collaboration avec le Ministère de la santé du Maroc, dans les régions méridionales et centrales de ce pays. Nous avons pu isoler, grâce au test au latex, 15 souches de *L. infantum* chez des chiens vivant habituellement en milieu rural :

- une en zone présaharienne, près d'Issafen dans l'Anti-Atlas, en octobre 1986, permettant de décrire pour la première fois *L. infantum* chez le chien dans l'étage aride (14),
- deux dans deux localités du versant sud du Haut-Atlas, également en octobre 1986, dans l'étage sub-humide (14),
- 12 dans la région de Tanent (Maroc central), en mars 1989, région où sévissent en sympatrie *L. tropica* chez l'homme et *L. infantum* chez le chien, dans l'étage semi-aride (11,12).

Toutes les souches isolées ont été identifiées comme appartenant au zymodème MON-1. Tous les animaux chez lesquels ces souches ont été isolées ont présenté une positivité au test au latex ainsi qu'à la réaction d'IFI au titre-seuil du 1/ 160, à une exception toutefois pour un chien dont l'IFI était au 1/20.

## Syrie

Deux souches de *L. infantum* ont pu être isolées, en juin 1990, chez deux chiens de la région de Kassab au nord du pays, près de la frontière turque, seule zone de l'étage sub-humide en Syrie. Ces deux souches sont les premières isolées et identifiées (MON-1) dans ce pays. Les deux chiens, ayant une activité de garde de troupeaux et de domicile, avaient une IFI et un test au latex positifs (13).

## Yémen

L'utilisation du test au latex nous a permis d'isoler quatre souches de *L. infantum* : trois dans la région de Taëz, en janvier 1989, chez des chiens féroces présentant une positivité au

test au latex et en IFI, et une dans la plaine côtière de la Tihama chez un chien domestique positif au test au latex et au 1/40 en IFI. Toutes les souches ont été rapportées au zymodème MON-1. L'enquête réalisée dans la région de Taëz a permis en particulier de mettre en évidence la situation en sympatrie de *L. infantum* chez le chien, vivant à l'état sauvage, mais pénétrant dans les villages la nuit, et de *L. donovani* chez l'homme (22).

Nous constatons donc qu'un tiers des souches isolées (13/39), grâce au test au latex, présentent des résultats en IFI inférieurs au seuil de positivité (1/160) habituellement retenu. Ceci confirme les très bonnes sensibilité et spécificité du TL.

Une utilisation récente du TL a également permis de démontrer son utilité dans le diagnostic de la leishmaniose viscérale humaine à l'occasion d'une enquête réalisée au Soudan (20).

## Conclusion

La sensibilité du test au latex est comparable, et dans certains cas supérieure, à celle de l'IFI. Les avantages sont ceux de la rapidité et de la simplicité de réalisation. Elle présente toutefois l'inconvénient d'être qualitative. Nous pensons qu'une application intéressante pourrait être celle d'une utilisation "de terrain" pour le dépistage de la leishmaniose canine (cabinets vétérinaires, enquêtes épidémiologiques) ou humaine dans des dispensaires médicaux de pays en voie de développement.

## Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier tout particulièrement les Professeurs J.P. DEDET et M. FIESCHI pour la relecture de ce travail ; les Docteurs P. BASTIEN, G. CALLEJA, M. GALLEGRO, G. MORENO, P. RISPAIL, MESSIEURS R. ETGES, J. GARCIA, M. PAGÉS, E. SERRES, R. TEISSIER et Madame C. ROUQUAIROL pour la préparation et la participation aux diverses missions ; Monsieur P. LAMI et Mesdames M. LEFEBVRE, A. MARTINI et G. SERRES pour le traitement des souches isolées. Nous exprimons également toute notre chaleureuse gratitude à Messieurs M. A. IZRI, Y. BOUDJEBLA, A. SADDIKI, B. MOUKI, K. SIRDAR, W. DAOUD et Y. EL KUBATI sans lesquels les missions en Algérie, Maroc, Syrie et Yémen n'auraient pas été possibles.

## Références bibliographiques

1. AMBROISE-THOMAS P - Sérodiagnostic de l'amibiase par un test rapide d'agglutination de particules de latex sensibilisées. Résultats de 462 examens et comparaison à la réaction d'immuno-fluorescence indirecte. *Bull Soc Path Ex*, 1974, **67**, 156-166.
2. BARUFFA G & ALCANTARA FA - Comparação entre o reagente Chagas-Latex e a imunofluorescência no diagnostico sorologico da Doença de Chagas na zona sul do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 1973, **7**, 329.
3. BENEX J - Le diagnostic sérologique pratique de la distomatose. 1° une méthode d'agglutination sur lame à l'aide d'antigène absorbé sur des particules de latex. *Bull Soc Path Ex*, 1964, **57**, 495-502.
4. BINZ G - An evaluation of the capillary and latex agglutination and heterophile antibody tests for the detection of *Trypano-soma rhodesiense* infections. *Bull OMS*, 1972, **47**, 773-778.
5. BOUREE P & DEVER JM - Latex agglutination test for echinococcosis. VIIe Int. Cong. Parasit. *Bull Soc Franç Parasitol*, 1990, **8**, 947.
6. BOUREE P & PAUGAM A - Tests au latex en parasitologie et mycologie. *Feuill Biol*, 1991, **32**, 49-56.
7. BÜSCHER P, DRAELANTS E, MAGNUS E, VERVOORT T & VAN MEIRVENNE N - An experimental latex agglutination test for antibody detection in human african trypanosomiasis. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 1991, **71**, 267-273.
8. COHEN J - A coefficient of agreement for nominal scales. *Educ Psychol Meas*, 1960, **20**, 37-46.

9. CUMMINS AJ, MOODY AH, LALOO K & CHIODINI PL - Development of a rapid latex agglutination test for the detection of visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1994, **88**, 300.
10. DE KORTE PM, HARITH AE, DEREURE J, HUIGEN E, FAUCHERRE V & VAN DER KAAY HJ - Introduction of an improved direct agglutination test for the detection of *Leishmania infantum* infection in Southern France. *Parasitol. Res.*, 1990, **76**, 526-530.
11. DEREURE J - *Place du chien dans les complexes pathogènes leishmaniens des pays du pourtour méditerranéen et du Moyen-Orient (Algérie, Egypte, France, Maroc, Syrie, Yémen)*. Thèse Faculté de médecine, Université Montpellier I, 1993, 179 p.
12. DEREURE J, RIOUX JA, GALLEGRO M, PERIERES J, PRATLONG F *et al.* - *Leishmania tropica* in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1991, **85**, 595.
13. DEREURE J, RIOUX JA, KHIAMI A, PRATLONG F, PERIERES J & MARTINI A - Eco-épidémiologie des leishmanioses en Syrie. Présence, chez le chien, de *Leishmania infantum* Nicolle et *Leishmania tropica* Wright (Kinetoplastida - Trypanosomatidae). *Ann Parasitol Hum Comp*, 1991, **66**, 252-255.
14. DEREURE J, VELEZ ID, PRATLONG F, DENIAL M, LARDI M *et al.* - *La leishmaniose viscérale autochtone au Maroc méridional*. In : *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. JA RIOUX édit. IMEEE, Montpellier, 1986, pp. 421-425.
15. DUMAS N, KAWAII K, BESSIERES MH & SEQUELA JP - Etude d'une réaction d'agglutination au latex pour le diagnostic de la toxoplasmose. *Ann Biol Clin*, 1983, **41**, 145-150.
16. ENDERS B, HUNGERER KD & ZWISLER O - Survey on Experiences with Latex-Chagas-Test in Various Countries. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 1975, **26**, 252-260.
17. LANOTTE G - *Le foyer de leishmaniose viscérale des Cévennes. Limites et structures. Essai méthodologique*. Thèse Biologie humaine Montpellier, 1975, 269 p.
18. LANOTTE G, RIOUX JA, CROSET H & VOLHARDT Y - Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 7. Dépistage de l'enzootie canine par les méthodes immunosérologiques. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1974, **49**, 41-62.
19. LANOTTE G, RIOUX JA, CROSET H & VOLHARDT Y - Dépistage de la leishmaniose canine. Stratégie d'enquête utilisée dans le foyer des Cévennes méridionales. In : *Colloques Internationaux du CNRS. N° 239. Montpellier (18-24 août 1974)*, 1977, pp. 117-128.
20. MOODY AH & EL-SAFI SH - A latex agglutination test for the serodiagnosis of visceral leishmaniasis in Sudan. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 522.
21. PRATLONG F, DEDET JP, MARTY P, PORTUS M, DENIEAU M, *et al.* - *Leishmania* - Human Immunodeficiency Virus Coinfection in the Mediterranean Basin: Isoenzymatic Characterization of 100 Isolates of the *Leishmania infantum* Complex. *J Infect Dis*, 1995, **172**, 323-326.
22. RIOUX JA, DEREURE J, DAOUD W, EL KUBATI Y, RAGEH H A *et al.* - Eco-épidémiologie des leishmanioses viscérales et cutanées en République arabe du Yémen. I. Présence, en conditions sympatriques, des complexes *Leishmania infantum* et *Leishmania donovani*. *Bull Soc Path Ex*, 1989, **82**, 658-664.
23. RIOUX JA, LANOTTE G, PRATLONG F, DEREURE J, JARRY D *et al.* - La leishmaniose cutanée autochtone dans le Sud-Est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. *Méd Mal Infect*, 1985, **11**, 650-656.
24. RIOUX JA, LANOTTE G, SERRES E, PRATLONG F, BASTIEN P & PERIERES J - Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp*, 1990, **65**, 111-125.