



# DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DES LEISHMANIOSES

**Dr Fatma Saghrouni Ep. Drira**

Laboratoire de Parasitologie

CHU Farhat Hached Sousse

# INTRODUCTION

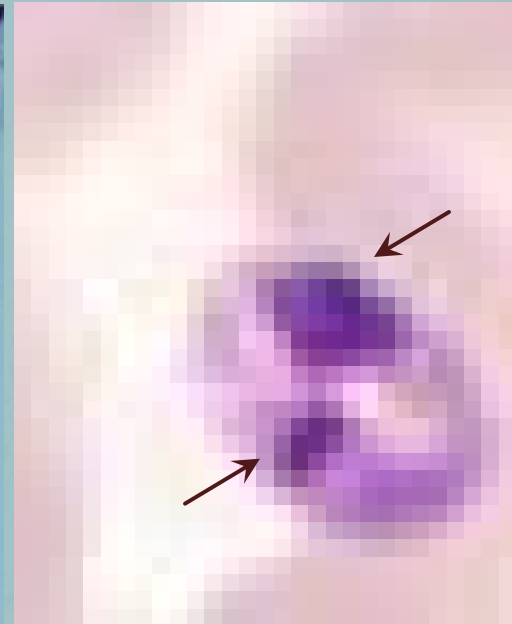
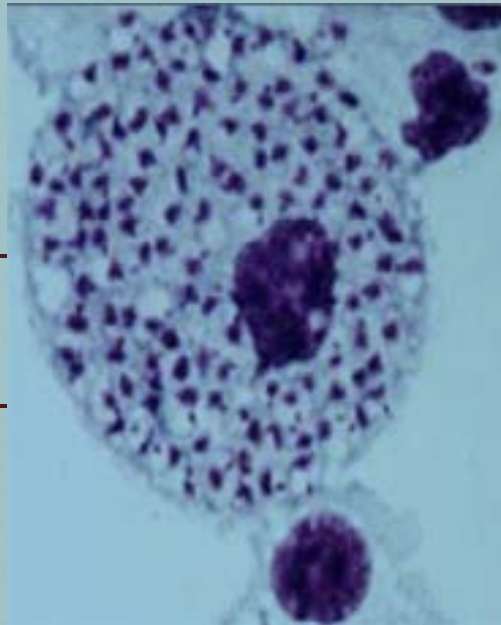
- Leishmanies: 2 formes:
  - **Amastigote** : chez l'hôte vertébré
  - **Promastigote**: chez le phlébotome vecteur

# LES LEISHMANIES

## Forme amastigote

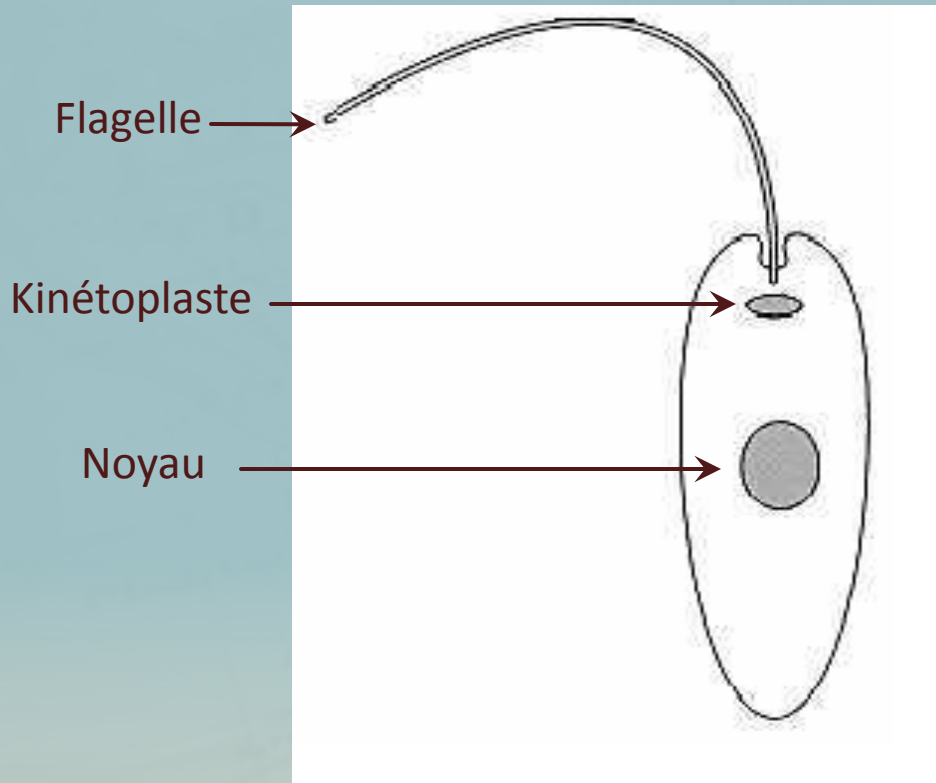
Kinétoplaste \_\_\_\_\_

Noyau \_\_\_\_\_



# LES LEISHMANIES

## Forme promastigote



# LES LEISHMANIES

- 20 aine espèces pathogènes pour l'Homme:
  - Espèces **viscérotropes**: Leishmaniose viscérale
  - Espèces **dermotropes**: leishmanioses cutanées
    - Espèces **mucotropes**: leishmaniose cutanéomuqueuse (Espundia)

# LES LEISHMANIOSES:

- **Leishmaniose cutanée localisée**
  - Lésion(s) localisée(s) au point de pique
  - Réaction inflammatoire (histiocytome) localisée
  - Réponse humorale faible ou inexistante
- **Leishmaniose cutanée diffuse**
  - Lésions diffuses, réponse humorale  $\pm$  importante
- **Leishmaniose cutanéomuqueuse**
  - Lésion cutanée  $\rightarrow$  atteinte muqueuse, réponse humorale  $\pm$  importante
- **Leishmaniose viscérale**
  - Hyperplasie cellules réticulo-endothéliales des viscères: rate, foie, GG
  - Réponse immune cellulaire Th2++, Réponse humorale++

# MOYENS DIAGNOSTIQUES

- Diagnostic parasitologique direct: ED et Culture
- Diagnostic moléculaire: PCR+
- Sérologie
- Antigénémie
- IDR à la leishmanine

# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

## 1) Examen direct:

- Frottis, oppositions, coupes anapath
- Fixation et coloration Giemsa+
- Observation microscope optique, x100
- Amastigotes intra ou extracellulaires
- Ac fluorescents (Immunofluorescence directe):
  - Peu utilisée
  - Microscope à fluorescence
  - Morphologie amastigote modifiée
  - Plus couteuse que ED/Giemsa



# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

## 2) Culture:

- Promastigotes ++ (culture amastigotes et inoculation animal pas pour le Dg)
- Milieux diphasiques: NNN++
- Milieux liquides: milieu de Schneider, de Grace, M199, etc.
- Incubation 22-28°C
- Examen de la culture: 1x/semaine
- Souvent se positive la 1<sup>ère</sup> semaine
- 4 semaines avant de rendre un résultat négatif
- Si culture pos:
  - Promastigotes mobiles
  - Rrepiquage 1x/sem pour maintient souche

# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

- Indispensable pour typage enzymatique de la souche
- Inconvénients de la culture:
  - Longue, fastidieuse
  - Contaminations bactériennes et fongiques
    - Conditions d'aseptie
    - Addition de Penicilline, Streptomycine et 5-flucytosine

# DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

- **Hybridation in situ** (1980s)
  - Sensibilité ++
  - Procédure complexe
- **PCR++** qualitative et RT-PCR
- Cibles pour le diagnostic: séquences conservées (*Leishmania* sp):
  - Régions conservées dans ADN kinétoplastique « KDNA » (minicercles++, 1000ers de copies) → Sensibilité ++
  - Gène de l'ARNr de la petite sous-unité
  - ITS 1, autres seq répétées ADN génomique
- Cibles pour identification espèce: seq variables ± sp d'espèce

# SÉROLOGIE

- Recherche d'IgG spécifiques
- IFI
- Agglutination directe (DAT)
- ELISA
  - Ag soluble brute,  $\pm$  purifié
  - Ag recombinant (rK39)
- Western blot: différentes bandes spécifiques
- Tests rapides (bandelettes): basés sur Ag recombinants, 10mn

# ANTIGÉNÉMIE

- Recherche d'Ag leishmaniens circulants:
  - Dans sérum, urines
  - Par Immunoblot, ELISA, Agglutination au latex

# IDR À LA LEISHMANINE

- Test cutané de Montenegro
- Explore l'hypersensibilité retardée type III
- Injection sous cutanée extrait Ag
- Lecture après 48-72h: mesure induration
- Témoigne d'un contact avec *Leishmania* spp
- Ne différentie pas infection ancienne, portage asymptomatique
- Pas pour le diagnostic
- Enquêtes épidémiologiques +

# DIAGNOSTIC DE LA LEISHMANIOSE VISCERALE

DIAGNOSTIC DE

LA LEISHMANIOSE VISCERALE

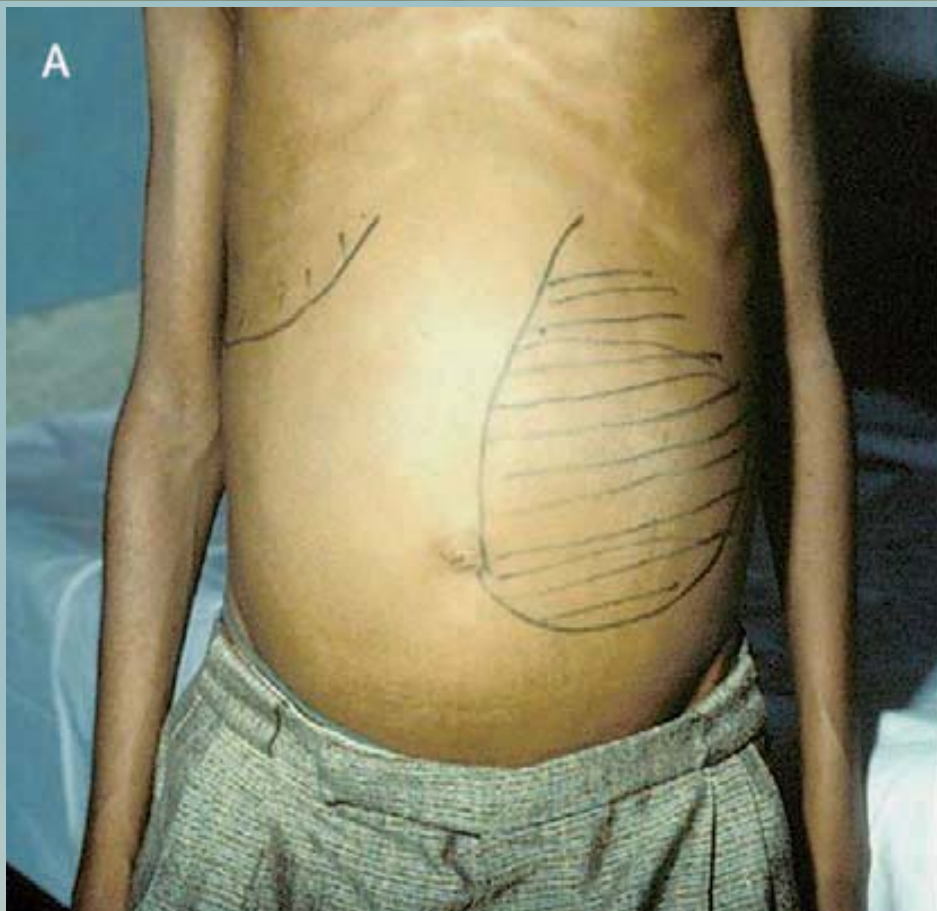


# LEISHMANIOSE VISCÉRALE

- **Orientation épidémiologique:** origine malade
  - Kairouan+ , Zaghouan+, Nord-est, Tunis, Sousse, Mahdia
  - Sfax, Sidi Bouzid, Kasserine, Tozeur: plus rare
- **Orientation clinique:**
  - Enfant en bas âge + ( $\leq 5$  ans)
  - Splénomégalie, Hépatomégalie, ADP
  - Fièvre (« folle »), pâleur, asthénie, amaigrissement
  - NFS: pancytopénie
  - EPP: hypergammaglobulinémie (IgG+), hypoalbuminémie
  - VS et CRP  $\uparrow$



# LEISHMANIOSE VISCÉRALE



# LEISHMANIOSE VISCÉRALE

- **Diagnostic biologique spécifique**
  - Recherche leishmanies: ED et culture
  - PCR
  - Prélèvements: MO, ponction splénique, aspiration ganglionnaire, sang périphérique
  - Sérologie
  - Antigénémie

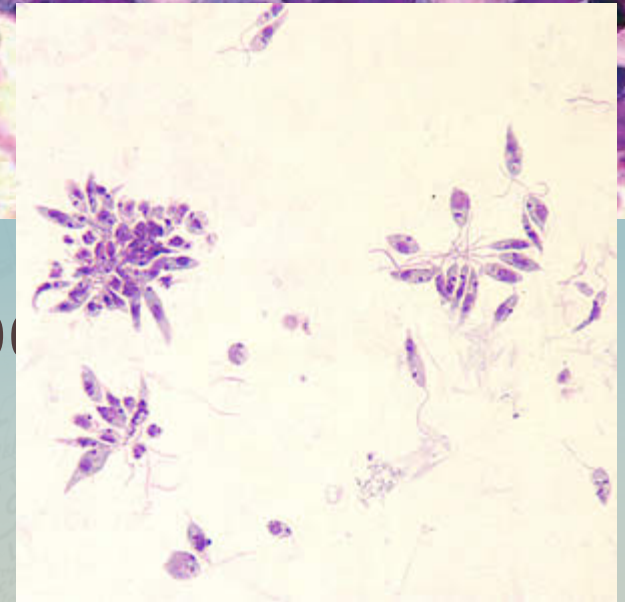
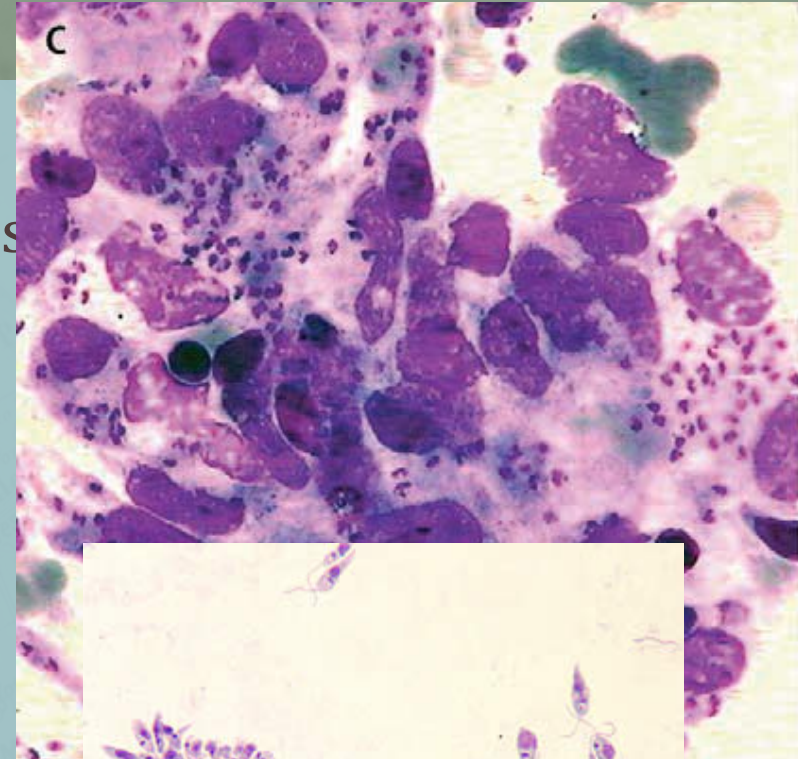
# PONCTION DE LA MOELLE OSSEUSE:



- Récupérer des faux neg à l'ED (jusqu'à 20%), isoler la souche
- Retard Dg % ED
- Spécificité: 100%
- Inconvénient: invasive, douloureuse,  $\pm$  VIH(+)

# PONCTION SPLÉNIQUE

- Sensibilité ++ (>95%)
- Inconvénient: Risque de rupture capsulaire
- Expérience opérateur++, Plaquettes
- Risque 2/10 000 patients
- ED:
  - Frottis ou apposition (biopsie)
  - Fixation et coloration Giemsa
  - Histologie: Hématoxyline éosine ±
  - Densité parasitaire: amastigotes/100
- Culture



# ASPIRATION GANGLIONNAIRE:

- Acte relativement anodin
- Injection-aspiration sérum physiologique dans ADP
- Suc prélevé:
  - ED: 40-50%
  - Culture
  - PCR
- Afrique de l'Est ++

# SANG PÉRIPHÉRIQUE

- Veine du pli du coude: 5-10ml
- Sur anticoagulant (citrate de sodium)
- Acheminement rapide, sinon garder à +4°C
- Cytocentrifugation: 50% LV méditerranéenne
- Couche leucocytaire
- Culture:
  - 1-2 ml sang + 10 ml citrate de sodium
  - Inoculer tubes par le culot cellulaire
- Culture couche leucocytaire: ~ 70% chez VIH+
- Sang sur filtre pour PCR (meilleur stockage, meilleure sensibilité que sang sur anticoagulant)

# AUTRES SITES DE PRÉLÈVEMENTS

- LV est une parasitose multiviscérale:
  - Ponction biopsie du foie: 40-90%
  - Prélèvement nasal: 28%
  - Prélèvement pharyngé: 36%

# PCR

- Tout type de prélèvement
- Sensibilité > ED et culture

- Intérêt de la PCR dans le diagnostic de la maladie

	ED (%)	Culture (%)	PCR (%)
— MO	55	55	82
GG	51	54	74

- PCR ELISA: détection de 0,1 promastigote ou 1 fg d'ADN

- Gr

	ED (%)	Culture (%)	PCR (%)
Sang périph (ID)	26	42	70-90

Prison

→ PCR mal adaptée au suivi thérapeutique

- PCR + porteurs asymptomatiques (36%): erreur Dg

→ Combiner PCR et Sérologie

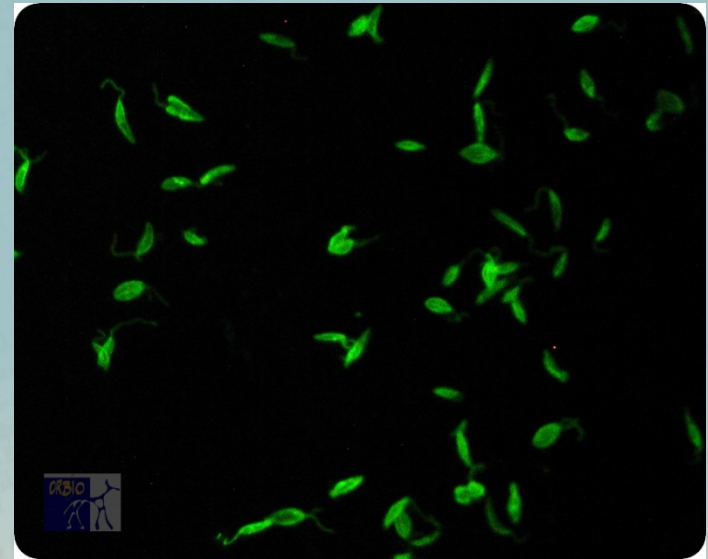


# SÉROLOGIE

- Grand intérêt diagnostique : LV titres des Ig élevés
- Inconvénients:
  - Sensibilité ↓ chez immunodéprimé (VIH+): 50%
  - Réaction croisée: Trypanosomiasis, toxoplasmose, Tbc
- Pas de valeur pronostique
- Intérêt suivi thérapeutique limité: Ac persistent pendant des mois après guérison

# SÉROLOGIE

- IFI:
  - Promastigotes fixés sur lames
  - Sensibilité ++
  - Microscope à fluorescence
  - Lecteur expérimenté



# SÉROLOGIE

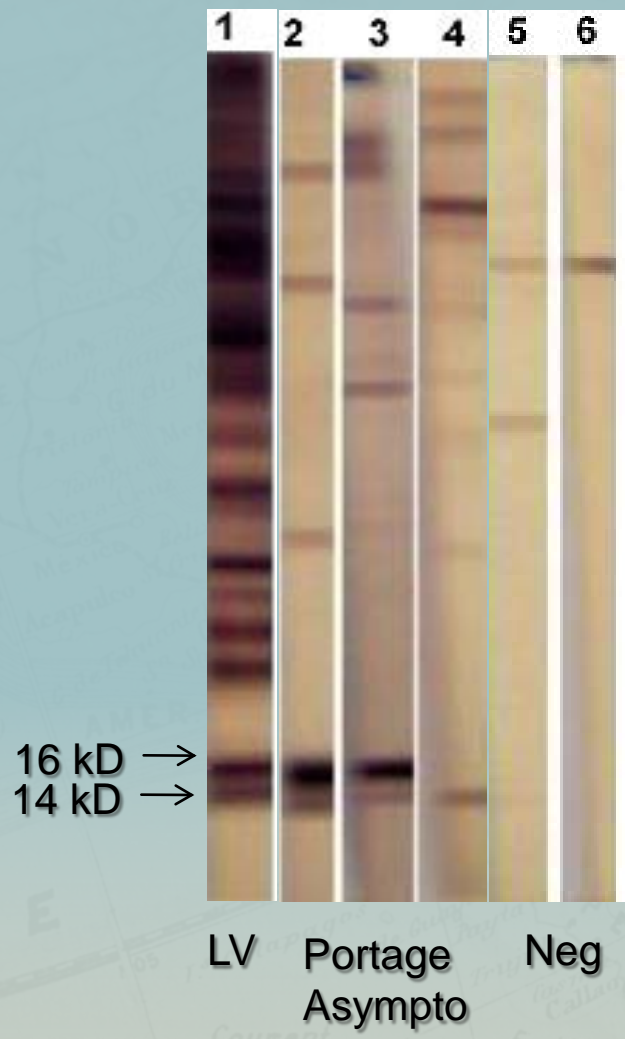
- DAT:
  - 1ère version:
    - Promastigotes tryptsinés fixés et colorés par le bleu de Coomassie
    - Incubation avec sérum patient longue (18 h ~1 nuit)
    - Sensibilité (91-100%) et spécificité (72-100%)
    - Respect chaîne de froid pour transport et conservation de l'Ag
  - 2ème version: « FAST »
    - < 3h
    - Ag thermostable, reproductibilité résultats
    - Une seule dilution: qualitatif (pos ou neg)
    - Recommandé par OMS (rapport qualité/coût ++)

# SÉROLOGIE

- ELISA: sensibilité +, spécificité dépend Ag
  - Ag soluble brut: faux pos +
  - Ag purifiés: plus spécifique mais Sensibilité ↓
  - Ligand Fucose-mannose: sb 100%, sp 96%
  - Ag recombinants:
    - rK39: spécifique à la LV active (100% sb et sp), suivi thérapeutique +

# SÉROLOGIE

- Western blot: sensibilité et spécificité ++
- Technique longue, couteuse et encombrante
- Les bandes varient selon l'étude
- Kit commercialisé: 14 et/ou 16 kDa
  - Sensibilité ↑: détection portage asymptomatique
    - Bandes 33, 24 et 22kD: en faveur d'une forme active



# SÉROLOGIE

- Tests rapides

- Conditions

- But: tester

- = tests sérologiques

- = test d'immunochromatographie rapide sur bandelette

- = Dispstick test

- 1<sup>er</sup> test commercialisé: Dispstick test rK39

- D'autres Ag recombinants: rK26, rK9 et rKE16 (récemment commercialisé)

	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
Inde	100	98
Soudan	67	59
Sud Europe	71	
Brésil	60-90	
Sousse	87	94

# ANTIGÉNÉMIE

- Ne dépend pas du statut immunitaire du patient
- Intérêt: immunodéprimé +

Forme active: tau	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
VIH+	68 -100	98-100
Immunocompétent	47-100	100

- Suivi thérapeutique
- Sang: problèmes amyloïde, CIC, autoAc, etc.

→ Recherche Ag dans les urines.

- ELISA, Western blot
- Kit commercialisé: KAtex<sup>®</sup> (agglutination particules Latex)



# CON-INFECTION VIH/LEISHMANIA

- Présentations cliniques atypiques
  - HMG-SMG-Fièvre < 50% cas
  - Atteinte intestinale, gastrique, pulmonaire, péricardite, etc.
- Diagnostic:
  - Couche leucocytaire: ED, culture et PCR
  - LBA, liquide pleural, biopsie intestinale
- Sérologie: sensibilité faible (50%)
- Antigénémie: urines (> 60%)

# DIAGNOSTIC DES LEISHMANIOSES TÉGUMENTAIRES



# LEISHMANIOSE CUTANÉE LOCALISÉE

- 1) **Orientation épidémiologique:** origine malade ou déplacement en zones endémiques
- 2) **Orientation clinique:**
  - Lésion cutanée au niveau des zones découvertes:
    - Evolution lente
    - Indolore
    - Sans ADP
    - Résistante aux ATB
  - Forme typique: « Bouton de Gafsa », « Bouton d'Orient », « Clou de Biskra », etc.
  - La plus fréquente

# LEISHMANIOSE CUTANÉE LOCALISÉE

- Diagnostic différentiel du Bouton d'Orient:
  - Pyodermite; Ecthyma, Furoncle, Abscès
  - Autres formes de LC: atypiques, inhabituelles
  - Nodules non ulcérés, lupoïdes
  - Érysipéloïdes, etc.
- Traitement toxique
  - Confirmation parasitologique avant tout traitement
  - Mais, en zones endémiques: diagnostic souvent clinique



# DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE

- 1) **Sérologie:** pas d'intérêt Dg
- 2) **IDR à la leishmanine:** pos mais n'a pas d'intérêt Dg
- 3) **Diagnostic parasitologique:**
  - Prélèvement:
    - Avant TTT
    - Au niveau des berges de la lésion (3-5 points)
    - Lésion la plus récente
    - Scarification au vaccinostyle (suc dermique) ++
    - Biopsie cutanée
    - Injection-aspiration sérum physiologique
  - ED, Culture et PCR

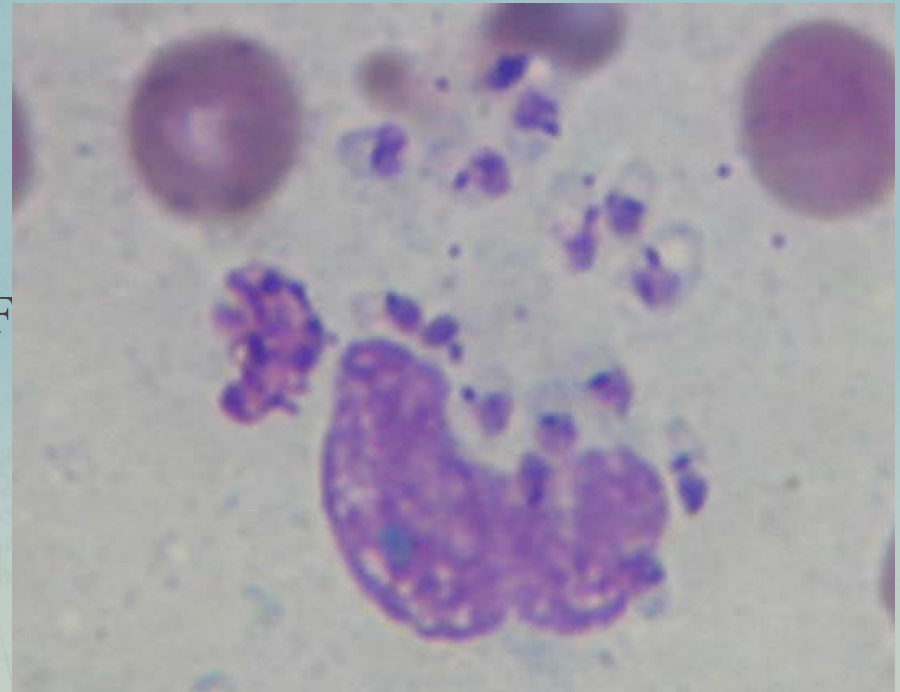
# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE



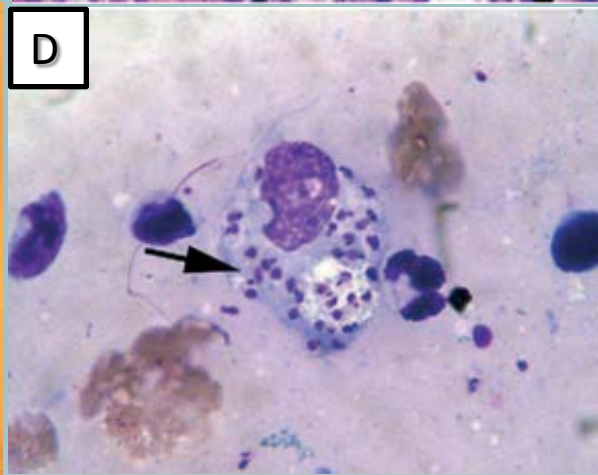
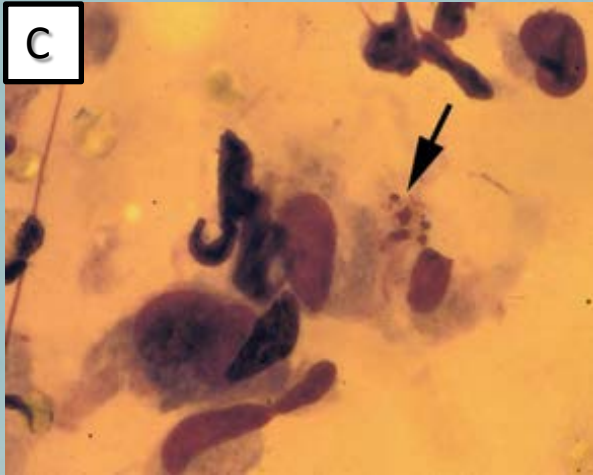
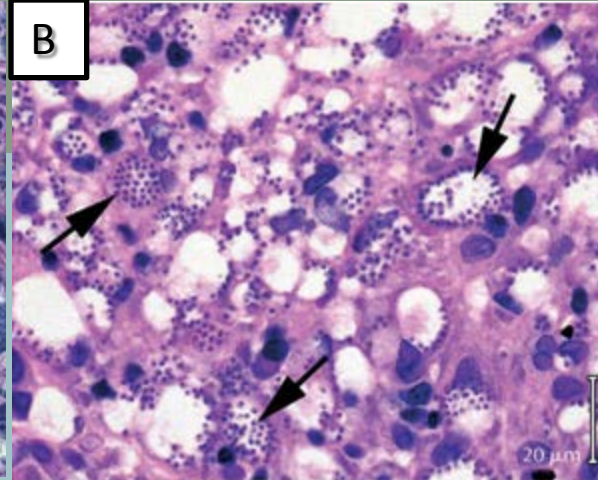
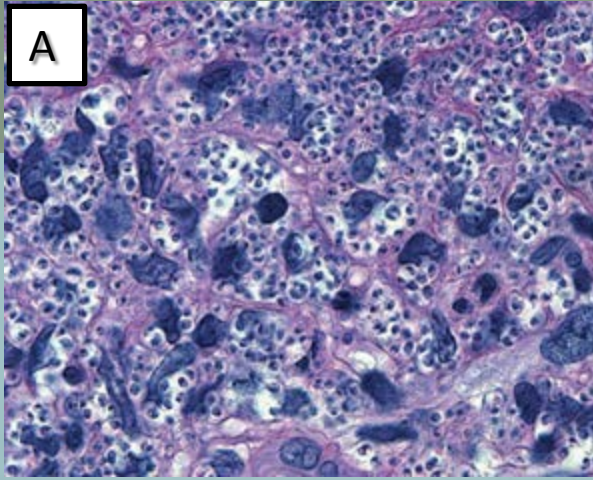
SCARIFICATION AU VACCINOSTYLE (SUC DERMIQUE)

# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

- ED:
  - Frottis, apposition, coupe anapath
  - Fixation, coloration Giemsa+
  - Sensibilité dépend:
    - Forme clinique
    - Ancienneté lésion
    - Surinfection  $\pm$
    - Sensibilité  $\uparrow$  Ac fluorescents (IF)







A- Biopsie cutanée (HE)

B- Biopsie cutanée (HE)

C- Apposition (Giemsa)

D- Frottis cutanés (Giemsa)

# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

- Faux négatifs à l'ED:
  - Ancienneté de la lésion
  - Lésion active à cause de la réaction inflammatoire due à la persistance de l'Ag parasitaire
  - Expérience du lecteur

# DIAGNOSTIC PARASITOLOGIQUE

- Culture:
  - NNN
  - Récupérer faux négatifs à l'ED
  - Isoler souche:
    - Identification espèce par typage enzymatique
    - Tester sensibilité au TT si suspicion résistance
  - Inconvénients:
    - Retard diagnostic % ED
    - Contaminations fréquentes dans les LC
    - Peu adaptée au terrain dans les zones endémiques (enquêtes épidémiologiques)

# DIAGNOSTIC MOLÉCULAIRE

- PCR:
  - Qualitative et RT-PCR
  - Différentes variantes selon la cible
  - Applicable sur tout type de prélèvement
  - Utilisée avec prélèvement à l'écouvillon (lésions ulcérées)
  - Avantages:
    - Grande sensibilité: récupérer faux neg à l'ED
    - Identifier espèce sans passer par la culture
  - Inconvénients:
    - Retard Dg % Ed
    - Infrastructure pour un labo spécialisé
    - Plus couteuse que ED
    - Peut rester pos même après guérison lésion

# LA LEISHMANIOSE CUTANÉE DIFFUSE



# LEISHMANIOSE CUTANÉE DIFFUSE

- **Orientation épidémiologique:** origine du malade
- **Orientation clinique:**
  - Lésions nodulaires diffuses
- **Confirmation parasitologique:**
  - ED, culture: présence de leishmanies au niveau des lésions
- **Sérologie:** souvent pos
- **IDR à la leishmanine:** anergie

A faded, light-colored map of South America is visible in the background, showing the outlines of the continent and some major cities and regions. The map is tilted slightly to the right. The text 'LEISHMANIOSE CUTANÉO-MUQUEUSE' is overlaid on the map in a dark red, serif font.

# LEISHMANIOSE CUTANÉO-MUQUEUSE

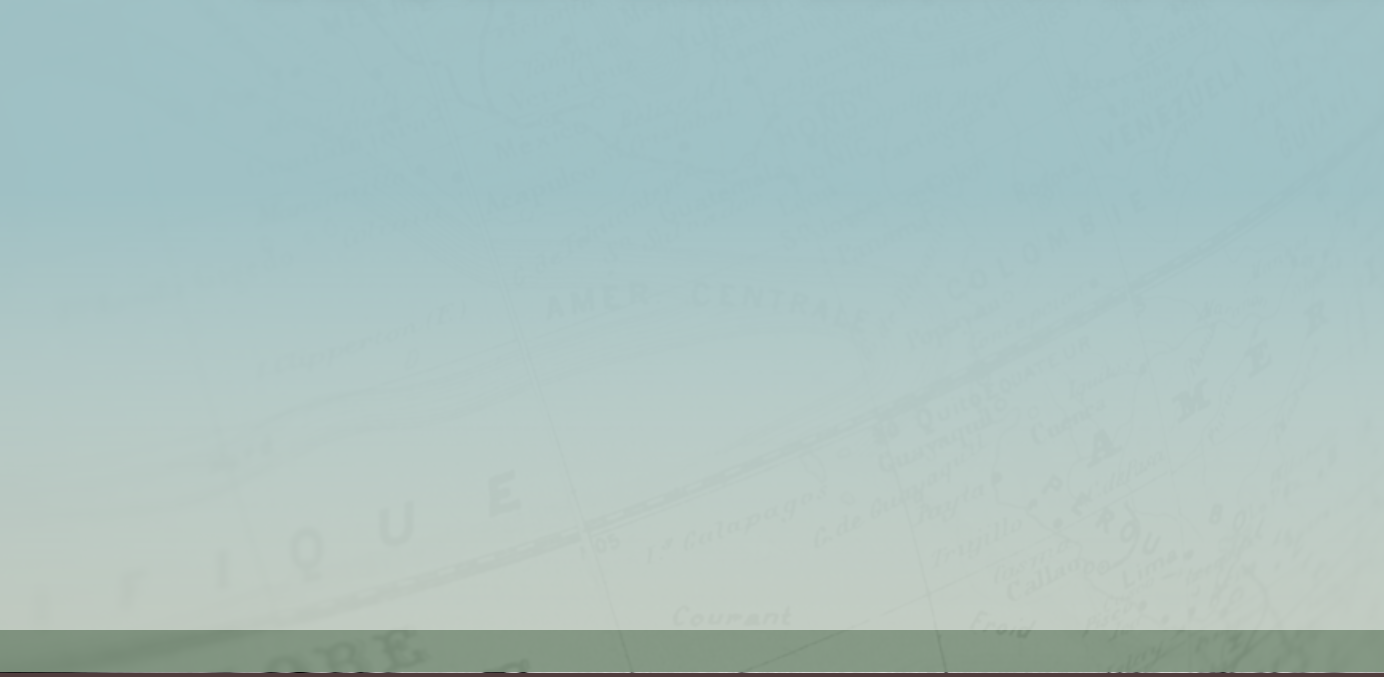
# LEISHMANIOSE CUTANÉO-MUQUEUSE



- **Orientation épidémiologique:** Amérique Latine
- **Orientation clinique:**
  - Lésions destructrices au niveau muqueuses: nez ++, pharynx, palais, etc.
  - ATCD de LC localisée
- **Confirmation parasitologique:**
  - ED, culture: présence de leishmanies au niveau des lésions
- **Sérologie:** peut être pos
- **PCR ++:** diagnostic et identification espèce



# IDENTIFICATION DE L'ESPÈCE LEISHMANIENNE



# IDENTIFICATION ESPÈCE LEISHMANIENNE

- Dans les leishmanioses tégumentaires surtout
- Elle s'impose dans un foyer où coexiste plus d'une espèce, pour:
  - Adapter le TTT:
    - L. killicki semble plus résistante aux glucantime que L. major
    - L. infantum peut donner des formes viscérales chez l'ID
  - **Connaître épidémiologie:**
    - Incidence, distribution géographique des espèces
    - Importance d'un cycle % l'autre
    - Identifier réservoirs et vecteurs
      - Mettre en place et évaluer une stratégie de lutte adaptée

# IDENTIFICATION ESPÈCE LEISHMANIENNE

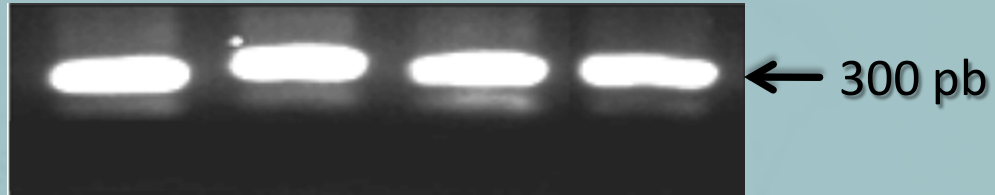
- Morphologie homogène des leishmanies
- Initialement basée sur des critères épidémiologiques et cliniques
- Puis, critères iso-enzymatiques:
  - Isoler la souche: nécessité d'une culture en masse
  - Certaines souches sont difficiles à isoler et à entretenir
    - Ex: Variants dermatropes de *L. infantum* (MON24, 80)
  - Tester différentes enzymes (10-20) pour obtenir un profil discriminatif
  - Longue et laborieuse, laboratoires de référence
  - Reste la technique de référence

# IDENTIFICATION ESPÈCE LEISHMANIENNE

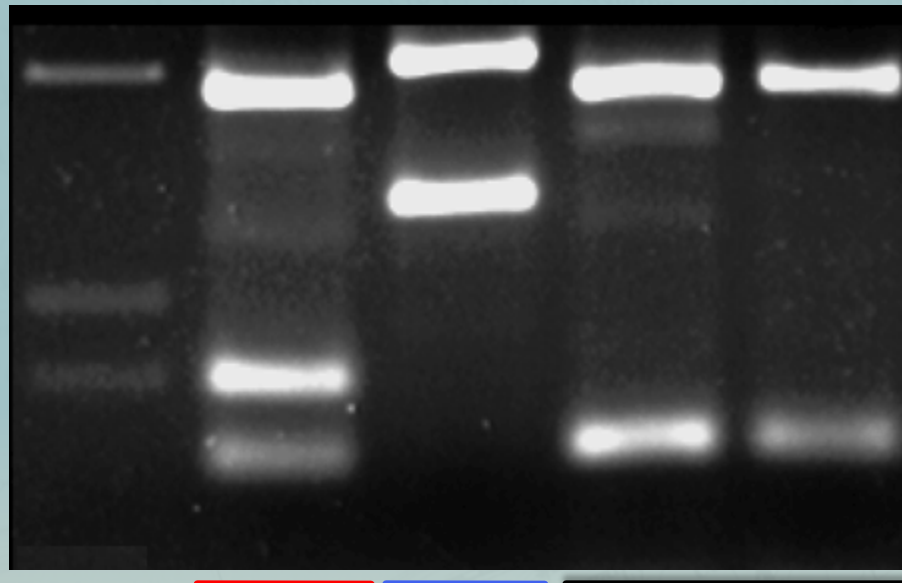
- Actuellement, la tendance = techniques moléculaires:
  - Avantage majeur: identifier espèce à partir du prélèvement sans passer par la culture
- Différentes variantes:
  - PCR → digestion par une enzyme de restriction: PCR-RFLP
    - Ex: PCR-ITS1 puis digestion par HaeIII: profil *L. infantum* ≠ *L. killicki* ≠ *L. major*
  - PCR → hybridation par sonde sp d'espèce
  - PCR → séquençage
  - Mini et microsatellites: nombre et taille des amplicons spécifiques pour une espèce donnée
  - RT-PCR → comparaison des Tm

# PCR-RFLP

PCR-ITS1



Digestion HaeIII



**L. infantum**

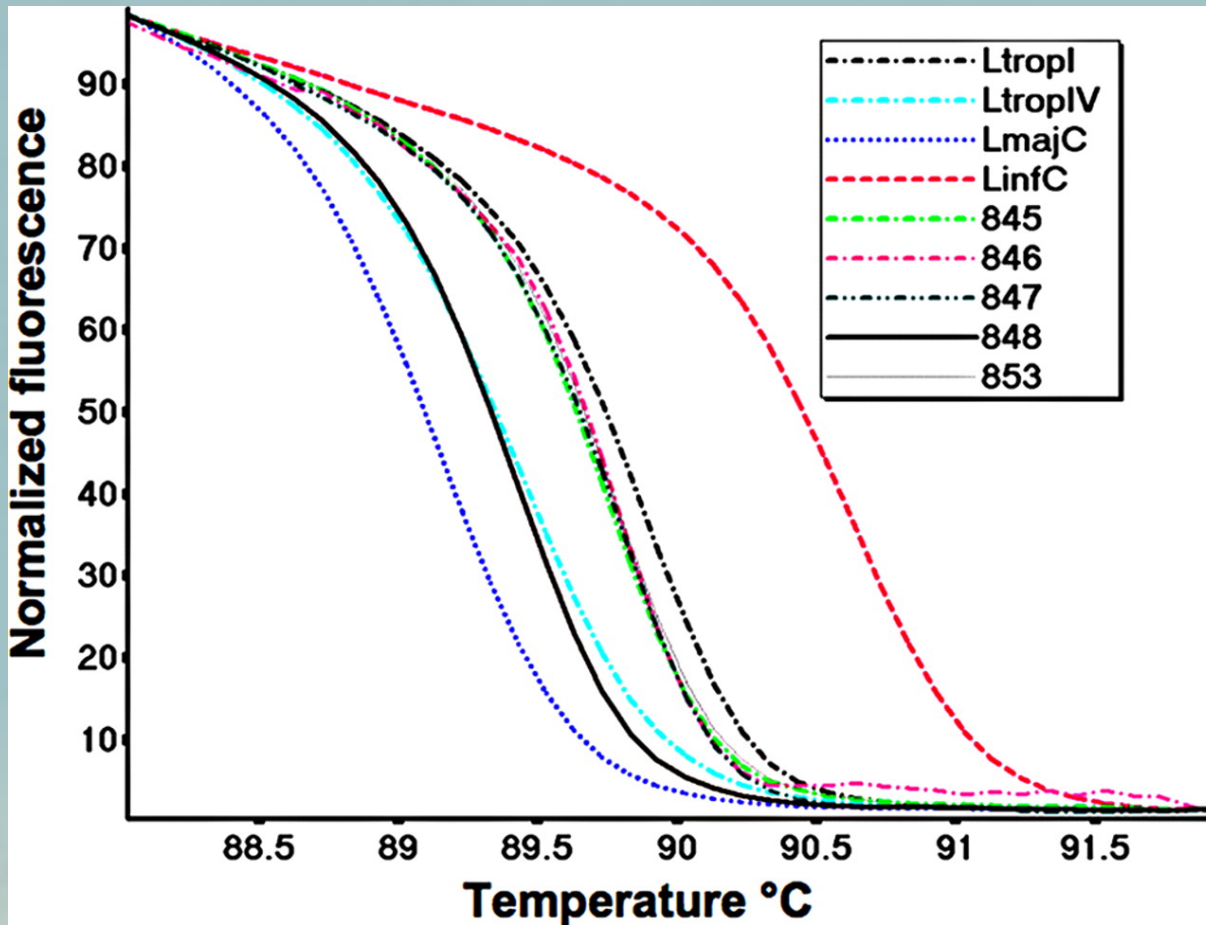
**L. major**

**L. tropica**

# IDENTIFICATION ESPÈCE LEISHMANIENNE

- Technologie HRM:
  - RT-PCR puis analyse des Tm dans des conditions de haute résolution
  - Réaction à tube fermé
  - Élimination de l'électrophorèse sur gel
  - Diminue les manipulations et le risque d'erreurs et de contamination/amplifiats
  - Reproductibilité interlaboratoires: possible si mêmes conditions techniques

# IDENTIFICATION ESPÈCE LEISHMANIENNE



7SL RNA gene

# CONCLUSION

- Les leishmanioses = les maladies vectorielles les plus fréquentes en Tunisie
- ED et culture = techniques de choix
- LV:
  - Ponctions de MO = invasives et manquent parfois de sensibilité
  - Techniques sérologiques (IFI, ELISA, DAT) sont bien standardisées.
  - Difficultés d'interprétation: immunodépression, infection ancienne, réactions croisées avec d'autres pathogènes.
- PCR: un grand apport, coûteuses, réservées aux laboratoires spécialisés.
- Leur sensibilité++: distinction difficile entre un portage asymptomatique et une forme active
  - Prudence dans l'interprétation: confrontation clinique



# RÉFÉRENCES

- Veeken H, Ritmeijer K, Seaman J, Davidson R. Comparison of an rK39 dipstick rapid test with direct agglutination test and splenic aspiration for the diagnosis of kala-azar in Sudan. Trop Med Int Health 2003;8:164-7.
- Bern C, Jha SN, Joshi AB, Thakur GD, Bista MB. Use of the recombinant K39 dipstick test and the direct agglutination test in a setting endemic for visceral leishmaniasis in Nepal. Am J Trop Med Hyg 2000;63:153-7.
- <http://www.leishmanioses.eur.st/>
- [dpd.cdc.gov/dpdx/html/Leishmaniasis.htm](http://dpd.cdc.gov/dpdx/html/Leishmaniasis.htm)