

LA CULTURE DU SANG PERIPHERIQUE COMME MOYEN DIAGNOSTIQUE DE LA LEISHMANIOSE VISCERALE : A PROPOS DE 61 CAS

S. BELHADJ, N.H. TOUMI, H. DAKHLIA, K. KALLEL, N. BOUSSEN, T. BEN CHAABANE, E. CHAKER

Med Trop 2002; **62** : 155-157

RESUME • Les auteurs rapportent une étude prospective ayant porté sur la recherche des leishmanies par culture sur milieu NNN de 61 prélèvements sanguins, provenant en majorité d'enfants immunocompétents atteints de leishmaniose viscérale. Les résultats obtenus par cette technique ont une sensibilité de 61 %, une bonne concordance avec la classique culture de la moelle osseuse et un délai de positivité plus long que celui des cultures de la moelle osseuse. Le caractère peu invasif de cette technique et la facilité de sa réalisation font que la culture du sang périphérique constitue d'une part, un moyen diagnostique de la leishmaniose viscérale et d'autre part, permet d'isoler la souche de leishmanie causale si la moelle osseuse n'a pas été cultivée dans le but d'un typage iso-enzymatique d'un intérêt épidémiologique considérable.

MOTS-CLES • Leishmaniose viscérale - Culture du sang périphérique - Enfants immunocompétents - Tunisie.

CULTURE OF PERIPHERAL BLOOD AS A DIAGNOSTIC MODALITY FOR VISCERAL LEISHMANIASIS : ASSESSMENT IN 61 CASES

ABSTRACT • The purpose of this prospective study was to assess the efficacy of culture of peripheral blood samples on NNN medium for detecting Leishmania. A total of 61 peripheral venous blood samples were tested. Most samples were collected from immunocompetent children presenting visceral leishmaniasis. The sensitivity of peripheral blood culture was 61%. Concordance with conventional bone marrow culture was good but the marrow technique was quicker. Since it is minimally invasive and easy to perform, peripheral blood culture is an attractive diagnostic alternative in immunocompetent patients. In addition peripheral blood culture presents a major epidemiological advantage in allowing identification of the causative strain of Leishmania if bone marrow culture was not performed for isoenzymatic characterization.

KEY WORDS • Visceral leishmaniasis - Immunocompetent patients - Peripheral blood culture - Tunisia.

La mise en évidence de leishmanies à l'examen direct ou après culture constitue l'élément diagnostique de certitude d'une leishmaniose viscérale. Pendant très longtemps, leur recherche a été pratiquée à partir de divers prélèvements : ponction de moelle osseuse (le plus souvent), ponction ou biopsie ganglionnaire, ponction hépatique ou ponction splénique effectuée seulement si la ponction médullaire est négative, en raison des risques d'hémorragie (1).

Un nouveau moyen diagnostique, moins invasif, de la leishmaniose viscérale, la recherche des leishmanies dans le sang, a montré récemment son intérêt, aussi bien chez le sujet immunodéprimé qu'immunocompétent (2-4).

Ce travail rapporte les résultats des cultures réalisées chez 61 malades atteints de leishmaniose viscérale et étudiée

l'intérêt et les limites de cette technique, comparée à la classique culture de moelle osseuse.

PATIENTS ET METHODES

Patients.

Il s'agit d'une étude prospective, réalisée au laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital La Rabta à Tunis sur une période de 2 ans et 10 mois (juin 1998-mars 2001) et ayant porté sur 61 sujets atteints de leishmaniose viscérale confirmée par un examen direct de la moelle osseuse positif (53 cas), ou une sérologie de la leishmaniose fortement positive par la technique d'immunofluorescence indirecte : taux 1/400 (seuil de significativité : 1/100) (8 cas).

Notre population est constituée d'enfants immunocompétents hospitalisés pour la quasi totalité d'entre eux à l'Hôpital d'Enfants de Tunis, ou à l'Hôpital Régional de Zaghouan ; trois seulement de nos patients sont des adultes dont deux sont infectés par le VIH.

Méthodes.

Pour chaque patient, un prélèvement de 5 ml de sang veineux périphérique dans un tube citraté stérile est réalisé. Le sang est centrifugé à 2500 tours/min pendant 10 min ; à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, la couche leucocytaire située à l'interface plasma-culot globulaire est prélevée et ensemencée sur le milieu de

• Travail du Service de Parasitologie-Mycologie (S.B., Médecin spécialiste principal de la Santé Publique ; K.K., Professeur agrégé ; N.B., Assistant ; E.C., Professeur, Chef de service), Hôpital la Rabta, Tunis, Tunisie, du laboratoire d'Hématologie (N.H.T., Professeur, Chef de service), Hôpital d'Enfants de Tunis, du service de Pédiatrie (H.D., Médecin spécialiste de la Santé Publique), Hôpital Régional de Zaghouan, Tunisie et du Service des Maladies Infectieuses (T.B., Professeur, Chef de service), Hôpital la Rabta, Tunis, Tunisie.

• Correspondance : S. BELHADJ, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital la Rabta, 1007, Tunis, Tunisie • Fax : +216 71 57 10 48 • e-mail : emna.chaker@rns.tn •

• Article reçu le 1/10/2001, définitivement accepté le 3/04/2002.

Novy-Nicolle-Mac-Neal (NNN). L'incubation se fait à 24°C. Les lectures et les subcultures sont effectuées toutes les semaines ; un délai d'un mois est exigé avant de rendre un résultat négatif.

La moelle osseuse, obtenue par ponction sternale ou iliaque, est ensemencée directement sur milieu NNN. L'incubation, les subcultures et les lectures sont réalisées dans les mêmes conditions que celles des prélèvements sanguins.

Une comparaison statistique des résultats a été réalisée par le calcul du coefficient de corrélation intragroupe «kappa».

RESULTATS

La recherche des leishmanies par culture sur milieu NNN de 61 prélèvements sanguins provenant de patients atteints de leishmaniose viscérale méditerranéenne s'est avérée positive chez 37 d'entre eux, soit une sensibilité de la culture de 61 %.

Trois de ces 37 malades ont un examen direct de la moelle osseuse négatif et deux de ces trois patients ont une culture de la moelle osseuse également négative.

Une recherche concomitante des leishmanies par culture du sang et de la moelle osseuse a été effectuée chez 49 de ces patients: La culture de moelle osseuse est positive 29 fois (59,18 %), celle du sang 28 fois (57,14 %) (Tableau I). Les résultats obtenus par ces deux techniques sont concordants chez 30 patients, soit un taux de concordance de ces deux techniques de 61,22 %. La comparaison statistique fixe la valeur du coefficient kappa à 0,20.

Concernant le délai de positivité des cultures, l'analyse des résultats obtenus montre que la culture de la moelle osseuse se positive plus précocement que celle du sang péri-

Tableau I - Résultats de la recherche concomitante des leishmanies dans le sang périphérique et la moelle osseuse chez 49 patients.

	Sang périphérique		Total
	Culture (+)	Culture (-)	
Moelle Osseuse			
Culture (+)	19	10	29 (59,18 %)
Culture (-)	9	11	20 (40,82 %)
<i>Total</i>	<i>28 (57,14 %)</i>	<i>21 (42,86 %)</i>	<i>49</i>

phérique (Tableau II). En effet, après une semaine, 68,96 % des cultures de la moelle osseuse sont positives, alors que les leishmanies n'ont été isolées du sang que dans 10,71 % des cas seulement.

D'autre part, le maximum des souches isolées à partir du sang est obtenu après deux semaines de cultures (60,72 %), et dans trois cas (10,71 %), la culture du sang n'est positive qu'après 4 semaines d'incubation.

Tableau II - Délai de positivité des cultures de la moelle osseuse et du sang périphérique.

	Une semaine		Deux semaines		Trois semaines		Quatre semaines	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Moelle osseuse	20	68,96	8	27,59	1	3,45	0	0
Sang	3	10,71	17	60,72	5	17,86	3	10,71

DISCUSSION

Bien que rapporté depuis 1924 par Knowles et Das-Gupta (5), le diagnostic de leishmaniose viscérale par la mise en évidence des parasites dans le sang périphérique ne s'est développé qu'avec l'apparition de la co-infection leishmaniose viscérale-Sida.

Cette recherche des leishmanies peut se faire, soit par examen direct du sang après leucocytocentrifugation (4,6,7), soit après mise en culture du sang sur des milieux appropriés tel que le milieu NNN (3).

Les résultats de notre étude montrent que la recherche des leishmanies par culture du sang périphérique, constitue un moyen diagnostique de la leishmaniose viscérale avec une sensibilité de 61 % chez l'immunocompétent, taux proche de celle rapportée par certains auteurs chez le sujet séropositif pour le VIH : 67 à 70 % (2,8).

Pour ce qui est des faux négatifs observés dans notre série (39 %), ils pourraient s'expliquer principalement par une difficulté de pousse de certaines souches de leishmanies, l'absence ou une faible parasitémie au moment du prélèvement, ou une quantité de sang prélevé insuffisante, inférieure à 5 ml (enfants anémiques).

L'analyse des résultats obtenus après mise en culture concomitante du sang et de la moelle osseuse, montre une sensibilité identique des deux techniques, avec des résultats similaires chez 30 patients (61,22 %), mais un délai de positivité de la culture du sang périphérique plus long que celui de la culture de la moelle osseuse, en rapport probablement avec une charge parasitaire plus faible.

La comparaison statistique de ces résultats montre une bonne corrélation de ces deux techniques, avec un coefficient de concordance kappa égal à 0,20 : coefficient variant de -1 (désaccord absolu), en passant par 0 (accord dû au hasard), à +1 (accord absolu) ; ceci a été constaté par Dereure et Coll. (3).

D'autre part, l'utilisation concomitante de ces deux techniques augmente la sensibilité de la culture à 77,55 %, permettant ainsi de récupérer 18 à 20 % des faux négatifs si une seulement des deux techniques est utilisée.

Ainsi la recherche des leishmanies dans le sang périphérique a un apport considérable dans le diagnostic du kala-azar. En effet, par sa bonne sensibilité, sa facilité de réalisation, son caractère peu invasif, elle peut être effectuée à la moindre suspicion clinique, particulièrement si la ponction de moelle osseuse est refusée par le malade.

Cette technique peut aussi être indiquée dans les cas où les autres examens sont négatifs, comme en attestent nos résultats.

Outreson apport diagnostique, cette technique permet d'isoler la souche si la moelle osseuse n'a pas été mise en culture, et ceci dans le but d'un typage iso-enzymatique, d'un intérêt épidémiologique considérable (9).

CONCLUSION

La mise en culture du sang périphérique, technique peu invasive, facile à réaliser, constitue un moyen diagnostique de la leishmaniose viscérale, aussi bien du sujet immunodéprimé qu'immunocompétent.

Elle peut être d'un grand apport diagnostique quand la ponction de la moelle osseuse ne peut être effectuée ou est refusée par le malade ou si les autres examens sont négatifs.

Cette technique permet également d'isoler la souche de leishmanie si la moelle osseuse n'a pas été mise en culture.

Le recours au diagnostic de la leishmaniose viscérale par cette technique, peu invasive et de sensibilité proche de celle de la culture de la moelle osseuse, ne doit pas faire oublier l'examen direct de la moelle osseuse qui reste la méthode diagnostique de référence et la PCR. Cette dernière technique offre un double avantage : sensibilité et précocité de diagnostic. Elle reste l'apanage des laboratoires spécialisés ■

Remerciements • Les auteurs remercient les Professeurs J-P. Dedet et F. Pratlong (Laboratoire d'écologie médicale et pathologie parasitaire, Faculté de Médecine de Montpellier, France) pour leurs conseils et leur aide précieuse pour la réalisation de ce travail.

REFERENCES

- 1 - QUILICI M, DUNAN S, RANQUE J - Diagnostic biologique des leishmanioses. *Med Trop* 1978; **38** : 385-389.
- 2 - DEDET JP, LAMBERT M, PRATLONG F - Leishmaniose et infection par le virus de l'immunodéficience humaine. *Presse Med* 1995; **24** : 1036-1040.
- 3 - DEREURE J, PRATLONG F, REYNES J *et Coll* - Haemoculture as a tool for diagnosing visceral Leishmaniasis in HIV negative and HIV positive patients : interest for parasite identification. *Bull World Health Organ* 1998; **76** : 203-206.
- 4 - BEN SAID M, AMRI F, MILI A *et Coll* - La cytoconcentration appliquée au diagnostic de la leishmaniose viscérale chez l'enfant immunocompétent. Communication préliminaire d'une étude faite en Tunisie. *Bull Soc Fr Parasitol* 1998; **16** : 86-94.
- 5 - KNOWLES R, DAS-GUPTA BM - The diagnosis of kala-azar by examination of thick blood films. *Indian Med Gaz* 1924; **59** : 438-440.
- 6 - IZRI MA, DENIAU M, ROBINEAU M *et Coll* - Nouvelle méthode de diagnostic de la leishmaniose viscérale. A propos de 7 cas de co-infection Leishmaniose-Sida. *Bull Soc Fr Parasitol* 1994; **12** : 3-6
- 7 - IZRI MA, DENIAU M, BRIERE C *et Coll* - Leishmaniasis in AIDS patients : results of leukocytoconcentration, a fast biological method of diagnosis. *Bull World Health Organ* 1996; **74** : 91-93.
- 8 - MALENFIR-GUILLOSSOU I - Intérêt du diagnostic de la leishmaniose viscérale sur sang périphérique au cours de l'infection à HIV de l'adulte. Thèse de Médecine, Marseille, France, 1998.
- 9 - PRATLONG F, MARTINI A, LAMBERT M *et Coll* - Intérêt de la culture et de l'identification iso-enzymatique des leishmanies dans le diagnostic et l'épidémiologie des leishmanioses. *Medecine et Armees* 1994; **22** : 61-65.

Université de la Méditerranée – Faculté de Médecine de Marseille

Institut de Médecine Tropicale du Service de Santé des Armées

DIPLOME UNIVERSITAIRE

« MEDECINE ET SANTE PUBLIQUE TROPICALE »

Pour tous renseignements, s'adresser à :

IMTSSA, Bureau des Etudes, BP 46
13998 MARSEILLE ARMEES

Tél : 04 91 15 01 05/09 • Fax: 04 91 59 44 77 • E-mail : imtssa@wanadoo.fr