

DIAGNOSTIC DÉLOCALISÉ PAR PCR TEMPS RÉEL DE LA LEISHMANIOSE CUTANÉE SÉVISSANT DANS LE FOYER DE CONSTANTINE (ALGÉRIE)

I. MIHOUBI, F. DE MONBRISON, N. ROMEUF, T. MOULAHM, S. PICOT

Med Trop 2006; **66** : 39-44

RÉSUMÉ • Compte tenu de la réémergence de la leishmaniose dans le monde, de la variabilité géographique de l'épidémiologie et de l'augmentation du nombre de voyageurs, une étude pilote sur le diagnostic de la leishmaniose cutanée a été réalisée à Constantine, l'un des foyers de l'est-algérien. 143 prélèvements ont été récoltés sur buvards et testés par PCR en temps réel et les résultats comparés à ceux de l'examen direct. Le diagnostic de leishmaniose par PCR a été positif dans 81 % des cas pour la PCR contre 48 % pour la microscopie. La PCR en temps réel a montré une différence quantitative significative entre les patients pour lesquels le diagnostic microscopique a été positif et ceux dont l'examen direct a été négatif. Les résultats présentés dans cette étude ont montré l'efficacité et la sensibilité de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée à partir des buvards. Avec cette technique, il a été possible de réaliser sur place un prélèvement à chaque malade et d'obtenir des résultats dans un délai court. Une collaboration Nord-Sud basée sur l'utilisation de moyens simples de transmission des échantillons pour le diagnostic moléculaire a permis de créer un partenariat efficace en terme de diagnostic quotidien et de favoriser ainsi l'échange de chercheurs afin de préparer le transfert de technologie.

MOTS-CLÉS • Leishmaniose cutanée - Diagnostic - PCR - Algérie.

OUTSOURCED REAL-TIME PCR DIAGNOSIS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN THE OUTBREAK REGION OF CONSTANTINE, ALGERIA

ABSTRACT • Taking into account the re-emergence of leishmaniasis in the world, the geographic variability of its epidemiology and the growing numbers of travellers, a pilot study on the diagnosis of cutaneous leishmaniasis was undertaken in Constantine, one of the outbreak regions in eastern Algeria. A total of 143 specimens were collected on blotters and tested by real-time PCR. Results were compared with those of direct examination. Diagnosis was positive for leishmaniasis in 81 % of cases using PCR versus 48 % of cases using microscopy. Real-time PCR showed a significant quantitative difference between patients for whom microscopic diagnosis was positive and those for whom direct examination was negative. The results presented in this study demonstrated the effectiveness and sensitivity of PCR in the diagnosis of cutaneous leishmaniasis from blotter specimens. This technique enabled in-field collection of specimens from each patient and provided prompt results. North-South cooperation based on the use of simple means for transmission of specimens for molecular diagnosis allowed creation of an effective partnership for daily diagnosis and promoted exchange between investigators in preparation for technology transfer.

KEY WORDS • Cutaneous leishmaniasis - Diagnosis - PCR - Algeria.

L'Algérie, qui compte parmi les pays les plus concernés par cette maladie (1), est caractérisée par plusieurs étages bioclimatiques (2) allant du climat méditerranéen au Nord au

climat saharien au Sud, en passant par de vastes zones semi-arides. De part sa forte population rurale, elle présente un terrain favorable à la propagation des formes cutanées et viscérales de la leishmaniose. La leishmaniose cutanée occupe deux zones distinctes. Au Sud, à l'étage aride, sévit la forme endémo-épidémique due à *Leishmania major*. Au Nord, à l'étage sub-humide, s'observe une forme endémique dont l'agent pathogène est un variant enzymatique de *Leishmania infantum* habituellement responsable de la leishmaniose viscérale. La leishmaniose cutanée se singularise par son extension rapide à partir des foyers anciens et devient de plus en plus fréquente au Nord, au sein même des zones d'endémie de la leishmaniose viscérale.

La leishmaniose cutanée du Nord (LCN) décrite sous le nom de «clou de Mila» par Sergent et Gueidon en 1923 (3) sévit à l'état endémique tout le long du littoral et du Tell Algérien. Sa répartition se confond avec celle de la leish-

• Travail du Laboratoire de Parasitologie et Mycologie du CHU Ben Badis, Constantine (Algérie) (I.M., Maître Assistante, Enseignant-Chercheur - Université Mentouri, Chargée de Recherche - CHU Ben Badis, T.M., Professeur - Faculté de Médecine - Praticien hospitalier, Médecin chef du Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, CHU Ben Badis,) et du Laboratoire de Parasitologie, Mycologie Médicale et Pathologie Exotique, (S.P., Professeur, Chef de Service, F.M., Maître de Conférence, Praticien Hospitalier, N.R., Collaboration technique) - E.A. 3732, Université Claude Bernard Lyon I, France.

• Correspondance : I MIHOUBI, Laboratoire de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Ben Badis de Constantine, Algérie • Fax : 213 31 94 89 55.

• Courriel : mihoubii@yahoo.fr •

• Article reçu le 21/04/2005, définitivement accepté le 16/12/2005.

maniose viscérale. Elle est signalée dans des régions encore indemnes : Oran, Tlemcen pour l'Ouest du pays et Annaba, Sétif, Collo à l'Est (4). Les foyers de Tizi Ouzou, Bouira, Béjaia, Constantine, Jijel, Mila et Ténès sont responsables du plus grand nombre de cas. L'agent mis en cause appartient au complexe *Leishmania infantum*. On trouve les zymo-dèmes MON-1, MON-24 et MON-80, le MON-24 ayant été isolé d'une femelle *Phlebotomus perfiliewi* à Ténès (5) et le réservoir est représenté par le chien. La LCN touche souvent les enfants et se localise préférentiellement au visage. Son évolution est longue et nécessite souvent un traitement afin d'accélérer le processus de cicatrisation qui ne se fait spontanément qu'au-delà d'une année.

Après avoir été cantonnée aux deux foyers de Biskra à l'Est et d'Abadla à l'Ouest, la leishmaniose cutanée zoonotique (LCZ) connaît une extension vers les hauts plateaux avec une survenue d'épidémie en 1982 à M'sila suivie d'une autre en 1985 à Ksar Challal (Tiaret). D'autres foyers sont apparus : El Oued, Ghardaïa, Bechar, Laghouat (Sud). Les nouveaux foyers du Nord concernent Batna, Medea, Tiaret et Bordj Bou Aridj. A l'heure actuelle, lesouches isolées de ces régions sont toutes identiques à *Leishmania major* MON-25. L'animal réservoir est le « rat des sables » ou *Psammomys obesus* (6). Le vecteur de la LCZ est *Phlebotomus papatasi*. La fréquence exacte de la LCZ est difficile à apprécier, on estime son incidence à plus de 2000 nouveaux cas par an. Elle se manifeste après une courte incubation et siège au niveau de la face et des membres. Les lésions sont multiples et évoluent vers la guérison spontanée en laissant une cicatrice inesthétique (7).

Le diagnostic repose surtout sur la clinique et la confirmation est apportée par la mise en évidence du parasite par microscopie et après culture. Il est malheureusement assez fréquent de ne pouvoir déceler le parasite dès l'examen direct pour peu que la lésion soit surinfectée ou le prélèvement mal effectué, particulièrement en dehors des centres spécialisés en zone endémique. La culture du parasite nécessite une infrastructure et du matériel qui ne sont pas partout disponibles et le risque de contamination est important.

L'objectif de cette étude était d'évaluer la possibilité d'effectuer un diagnostic différencié par PCR sur des échantillons prélevés à Constantine par apposition de papiers buvards sur les lésions et envoyés ensuite par la poste, dans des conditions d'acheminement normal, à un laboratoire spécialisé à Lyon.

La PCR à partir des buvards a été appliquée avec succès dans le cadre du paludisme (8) et il était logique de tenter de l'utiliser pour le diagnostic de la leishmaniose. L'intérêt était de s'affranchir des contraintes techniques dans les laboratoires de zone d'endémie tout en bénéficiant de méthodes très performantes de diagnostic.

PATIENTS ET MÉTHODES

Il s'agit d'une étude prospective réalisée au laboratoire de Parasitologie et de Mycologie du CHU de Constantine, sur une période d'une année et ayant porté sur

185 sujets orientés dans ce service après diagnostic clinique de leishmaniose cutanée. Les critères d'inclusion de ces malades dans l'étude étaient : lésion cutanée cliniquement évocatrice de leishmaniose cutanée, absence de traitement spécifique préalable, évolution clinique favorable sous traitement spécifique. Les critères d'exclusion étaient : surinfection de la lésion, impossibilité de prélèvement ou traitement anti-leishmanien dans les trois mois précédant l'étude. Tous les patients ont été examinés par le même médecin spécialiste et ont reçu un traitement adapté au cours de l'étude.

Pour chaque patient, un prélèvement de sang et/ou de sérosités a été réalisé, après avoir obtenu leur consentement éclairé, par application d'une bandelette de papier Whatman 3 MM, sur la lésion débarrassée de sa croûte. En parallèle, le produit de raclage de la lésion a été étalé sur lame (3 lames/malade), puis fixé par du méthanol pendant 1 minute et coloré au May-Grunwald-Giemsa pendant 20 minutes. Un examen microscopique des lames a été réalisé par le même biologiste spécialiste.

Les prélèvements sur papier ont été complètement séchés à l'air libre et séparés les uns des autres avec du papier absorbant, afin d'éviter d'éventuelles contaminations. Les échantillons ont été référencés et conservés ensuite dans des sacs hermétiques, à l'abri de la chaleur et de l'humidité. Les sacs ont ensuite été mis sous plis fermés, puis envoyés par courrier normal (par voie aérienne), en vue du diagnostic moléculaire au laboratoire de Lyon.

Diagnostic moléculaire

La bandelette de papier Whatmann est découpée, dans un tube Eppendorf stérile, en petits morceaux et incubée à température ambiante dans une solution de saponine à 5 % pendant une heure. Après avoir éliminé le surnageant, l'ADN est extrait avec la résine Instagene (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). 200 µl de résine sont ajoutés et le tube est placé pendant 30 minutes à 56°C au bain-marie, puis dans l'eau bouillante pendant 8 minutes. Après centrifugation, le surnageant est dilué au 1/5 dans de l'eau stérile et conservé à -20°C avant la PCR.

La PCR en temps réel du genre *Leishmania* a été réalisée par Lightcycler selon la technologie SybrGreen, en tubes capillaires. L'intensité lumineuse émise par le fluorochrome, mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification, est proportionnelle à la quantité de l'ADN cible présent dans l'échantillon. L'identification du produit de PCR est faite au cours d'une phase de *melting* post amplification par l'analyse de la température de fusion spécifique du produit amplifié.

Le volume final par capillaire est de 20 µl réparti entre 5 µl d'ADN, 2 µl de tampon Fast Start DNA master SybrGreen I (Roche Molecular Biochemicals), 4 mM de MgCl₂, 0,5 µM de chaque amorce (JW11, JW12) et l'eau stérile. Les amorces JW11 et JW12 ont été choisies sur la partie conservée de l'ADN des gènes codant les minicircles pour permettre l'amplification du genre *Leishmania* (9). Les conditions de la PCR sont les suivantes : après une dénaturation de 4 minutes à 95°C, l'amplification se déroule pendant 35 cycles avec une étape de dénaturation (95°C pendant 10 secondes),

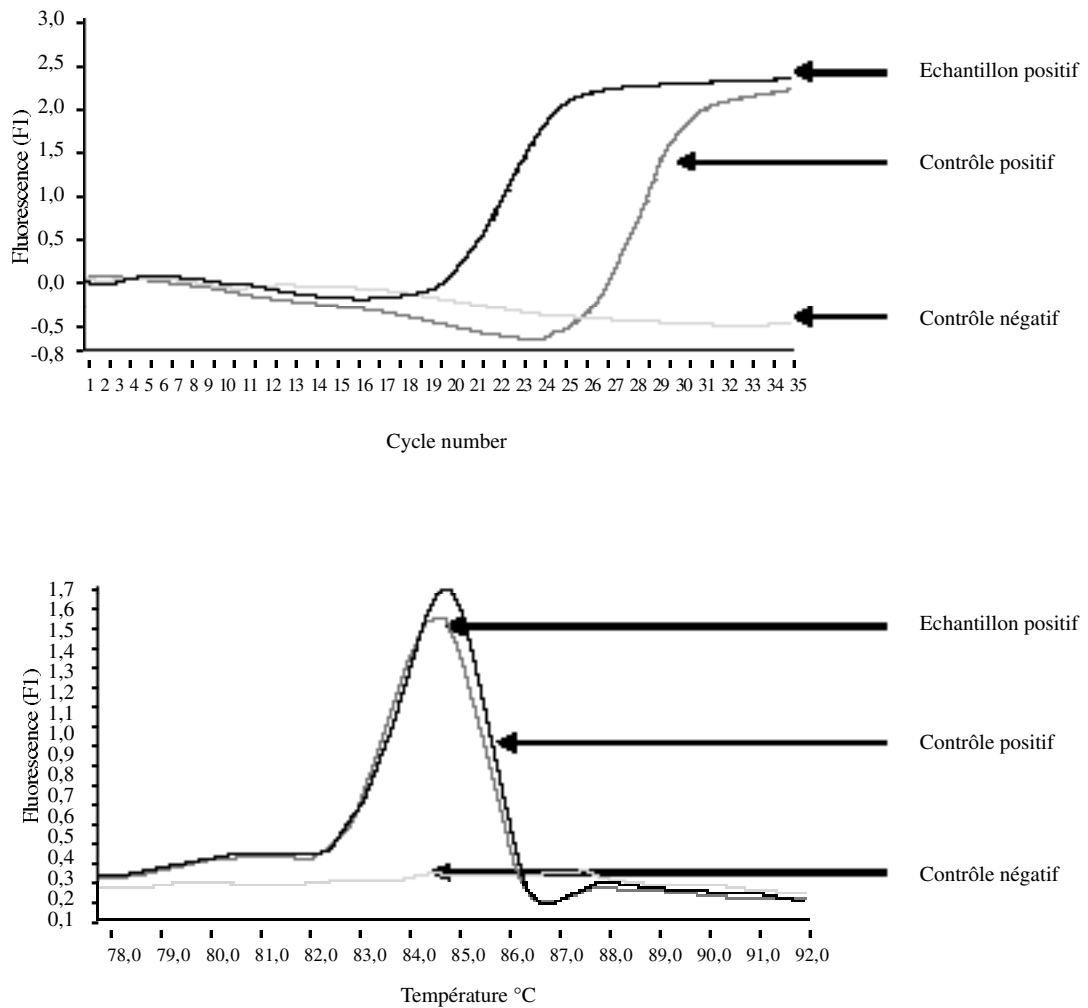


Figure 1 - Courbes d'amplification et de fusion obtenues avec les amorces JW11 et JW12

Haut : courbes d'amplification.

Bas : courbes de fusion et température de fusion spécifique du produit amplifié (84,5°C).

Un témoin positif (*L. infantum*) et un témoin négatif (sang humain non parasité) sont inclus dans chaque série.

Un échantillon est positif quand il présente une courbe d'amplification et une température de fusion identiques à celles du témoin positif.

d'hybridation (62°C pendant 10 secondes) et d'élongation (72°C pendant 10 secondes). La température d'hybridation est pour la phase de *melting* de 67°C pendant 15 secondes. La température de fusion du produit obtenu est 84,5°C. Un contrôle négatif (sang humain total non parasité) et un contrôle positif (*L. infantum*) sont inclus dans chaque série (Fig. 1).

Le typage enzymatique n'a pas été réalisé dans cette première phase du programme dont l'objectif était l'amélioration du diagnostic individuel.

RÉSULTATS

Patients

Pendant la période de l'étude, 135/185 (73%) patients ont été inclus. Le sex-ratio est de 1,33 (77 hommes/58 femmes). L'âge moyen est de 28,7 ans (médiane : 24) pour les hommes

et 36,9 ans (médiane : 39,5) pour les femmes, avec des extrêmes allant de 1 an à 84 ans. Les enfants (moins de 16 ans) représentent 17,5% de l'ensemble des malades. Les malades provenaient de Constantine et de ses environs (Ibn Ziad, Zighoud Youcef, Didouche Mourad, El Khroub, Hamma Bouziane, Athmania) ainsi que d'autres wilaya (Skikda, Guelma, Sétif, Mila, Oum El Bouaghi). La répartition géographique des lieux d'habitation des malades est représentée sur la carte de la région de Constantine (Fig. 2). Quelques malades (8/135) étaient originaires du Sud (El Oued, Boussaada, Hassi Messaoud).

Cliniquement, les lésions siégeaient le plus souvent sur les parties découvertes : la face (61 patients, 45%) et les membres (42 patients, 31%). Les lésions étaient parfois multiples et présentaient différents aspects illustrés sur la figure 3. Elles variaient entre 1 et 4 cm de diamètre.

Il est à noter que la majorité des patients présentant un examen direct positif provenait de la ville de Constantine

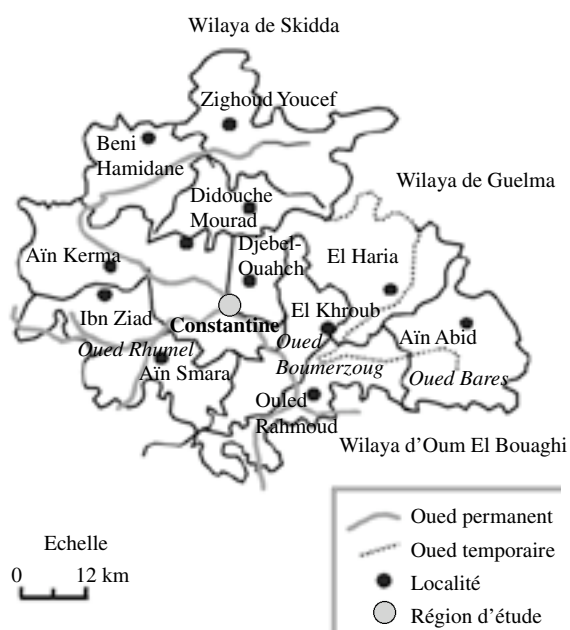


Figure 2 - Carte représentant la wilaya de Constantine et les régions concernées par l'étude.

(35,93%) suivie des régions de Ibn Ziad, Zighoud Youcef. Les zones de Didouche Mourad, El Khroub et Hamma Bouziane présentaient un nombre de malades équivalent. Les autres wilaya : Skikda, Guelma, Mila et Oum El Bouaghi représentaient un nombre de malades nettement inférieur à celui de Constantine. Il n'y avait pas de différence concernant la fréquence de positivité de l'examen direct ou de la PCR selon l'origine géographique des patients ou le type de lésion.

Examen parasitologique

143 examens parasitologiques des lésions cutanées ont été examinés pour les 135 malades, certains d'entre eux présentant plusieurs lésions. L'examen microscopique était positif pour 69 des 143 échantillons (48,25%), ce qui correspondait à 64 malades positifs sur 135 (44,75%).

Diagnostic moléculaire

La PCR quantitative en temps réel a été positive pour 117/143 prélèvements (81,81%), correspondant à 110/135 patients (81,5%). L'augmentation de la sensibilité du diagnostic biologique obtenu par l'utilisation de la PCR par rapport à l'examen direct était donc de 46/135 malades, soit 34%.

Tous les malades ayant présenté un résultat négatif par PCR avaient un examen microscopique négatif. Par ailleurs, parmi les malades ayant deux prélèvements (8 malades), un seul avait un résultat de PCR positif pour l'une des lésions et négatif pour l'autre, l'examen direct étant négatif pour les deux.

La PCR en temps réel sur Light-Cycler nous a montré qu'il existait une différence quantitative significative entre les patients pour lesquels le diagnostic microscopique était positif et ceux qui étaient négatifs. En effet, les malades pour lesquels l'examen microscopique était positif présentaient une limite de détection moyenne de $19,56 \pm 0,108$ cycles de PCR pour une moyenne de $28,47 \pm 0,059$ ($p < 0,01$) chez les patients dont l'examen direct était négatif.

DISCUSSION

Aucune donnée prospective n'était disponible concernant l'incidence de la leishmaniose cutanée dans la région de Constantine. Compte-tenu de la réémergence de cette maladie dans le monde, de la variabilité géographique de l'épidémiologie et de l'augmentation des voyageurs, il était important de mettre en place une étude pilote sur le diagnostic de la LC dans cette zone (10). Cette première étude prospective nous a permis de mieux cerner l'ampleur que prenait cette maladie au sein de l'un des foyers de l'Est algérien.

Bien que l'examen direct après coloration soit l'examen le plus adapté pour le diagnostic de la leishmaniose cutanée en zone d'endémie (7), son taux de positivité n'est que de l'ordre de 20% (11). La culture donne également des

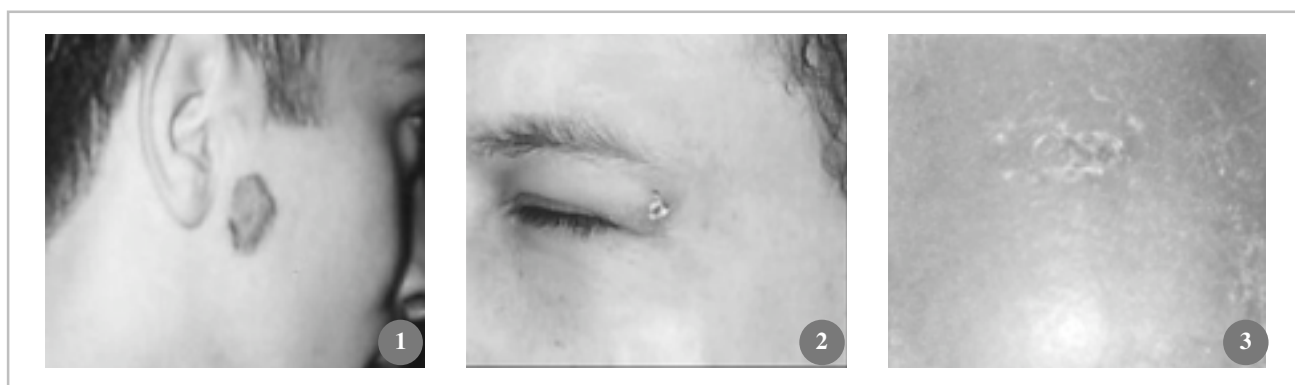


Figure 3 - Leishmaniose cutanée localisée à Constantine (Algérie). Les lésions observées sont verruqueuses (photo 1), nodulaires indurées recouvertes d'une croûte adhérente (photo 2), ulcéro-croûteuses (photo 3).

résultats assez remarquables, mais comporte un certain nombre d'inconvénients, notamment lorsque les lésions sont surinfectées (12). Il est donc intéressant de compléter ces examens par un diagnostic moléculaire : la PCR en temps réel, en l'occurrence.

La PCR en temps réel a été utilisée en raison de ses performances techniques et de la possibilité ultérieure d'adapter cette méthode à d'autres types de prélèvements, au diagnostic d'espèce et à la recherche de polymorphismes nucléotidiques (9).

Les résultats présentés dans cette étude ont montré l'efficacité et la sensibilité de la PCR dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée. Selon Rodriguez (13), la collection des exsudats sur buvards serait une meilleure alternative que les biopsies pour le diagnostic des LC par PCR. Ces buvards ont été pratiques et faciles à réaliser, notamment dans les pays du Sud ne possédant pas d'équipements nécessaires pour établir un diagnostic spécialisé ou permettant d'entreprendre ce type d'initiative. Avec cette technique, il a été possible de pratiquer un prélèvement sur place à chaque malade moyennant un coût dérisoire. Les résultats sont obtenus dans un délai court, toujours inférieur à celui d'une culture, tout en attendant un transfert de technologie vers le pays d'endémie.

L'étude présentée ici a permis d'obtenir une cartographie partielle de la transmission de la LC à Constantine et en périphérie pendant l'année 2004. Conformément à ce qui est exprimé de façon informelle par les médecins locaux, la transmission de la LC était une réalité inquiétante. En effet, au cours de cette étude non exhaustive, 135 cas de LC ont pu être diagnostiqués cliniquement et 117 confirmés biologiquement.

Face à la difficulté de réalisation des méthodes performantes de diagnostic biologique de la LC en zone d'endémie et face à la précarité des moyens mis en œuvre par les acteurs locaux, nous avons voulu mettre en place une collaboration Nord-Sud. Elle était basée sur l'utilisation de moyens simples de transmission des échantillons (courrier normal), des techniques efficaces de diagnostic moléculaire (PCR temps réel) et des outils très répandus de communication des résultats (Internet). Un tel partenariat a été efficace en terme de diagnostic quotidien. Il a été également porteur d'avenir car il a favorisé la constitution de réseau Nord-Sud, l'échange de chercheurs, et a préparé le transfert de technologie qui était l'objectif à atteindre à terme.

La PCR est une technique spécifique et sensible (14, 15). La détection de l'ADN parasitaire par PCR, à partir des prélèvements cutanés, est la technique la plus sensible dans le diagnostic de la leishmaniose cutanée (16). Par ailleurs, son application pour la détection des leishmanies, à partir de différents échantillons cliniques, des réservoirs et des vecteurs, trouve son intérêt dans les études épidémiologiques (17).

La PCR en temps réel a l'avantage d'être rapide (moins d'une heure) et diminue les risques de contamination (18). Elle pourrait, dans l'avenir, compléter les techniques conventionnelles de diagnostic des leishmanioses (9) et être utilisée, à des fins épidémiologiques et expérimentales, dans

le cadre de l'évaluation de la charge parasitaire durant la phase post-thérapeutique (19). De plus, La PCR quantitative semble être le meilleur marqueur de l'efficacité clinique du traitement dans les LC (20). L'inconvénient majeur est que ces tests sont onéreux et souvent réservés aux pays riches qui ne sont pas les plus concernés par ce genre d'épidémie.

Nos résultats ont corroboré d'une part les travaux d'Osman (21) effectués sur la leishmaniose viscérale, où les auteurs notent un seuil de positivité de la PCR des ponctions de moëlle et des ponctions spléniques nettement plus élevé que pour l'examen direct et d'autre part, les travaux de Wortmann (18), sur les prélèvements cutanés.

De plus, face à l'ampleur prise par cette zoonose dans le Maghreb, il serait intéressant de faire une étude multicentrique et exhaustive afin de mieux cerner le fonctionnement éco-épidémiologique de ce foyer et de définir une démarche prophylactique adéquate en plus d'une orientation diagnostique et thérapeutique contrôlée. Une information éclairée de la population sur cette affection ne pourrait que contribuer à la régression de cette zoonose.

RÉFÉRENCES

- 1 - HARRATZ, BELKAID M - Les leishmanioses dans l'Algérois. Données épidémiologiques. *Bull Soc Pathol Exot* 2003 ; **96** : 212-4.
- 2 - STEWART P - Un nouveau climagramme pour l'Algérie et son application au barrage vert. *Bull Soc Hist Nat Af Nord* 1974 ; **65** : 239-52.
- 3 - SERGENT Et , GUEIDON E - Chronique du Bouton d'Orient en Algérie, le «clou de Mila». *Arch Inst Pasteur Alger* 1923 ; **1** : 1-3.
- 4 - BELAZZOUG S, AMMAR-KHODJA A, BELKAID M *et Coll* - La leishmaniose cutanée du Nord de l'Algérie. *Bull Soc Pathol Exot* 1985 ; **78** : 615-22.
- 5 - IZIRIMA, BELAZZOUG S - Phlebotomus [*Laroussius*] *perfiliewi* naturally infected with demotrophic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1993 ; **87** : 399.
- 6 - BELAZZOUG S - Le nouveau foyer de leishmaniose cutanée de M'sila (Algérie). Infestation naturelle de «*Psammomys obesus*» (rongeur, gerbillidé). *Bull Soc Pathol Exot* 1983 ; **76** : 146-9.
- 7 - MARTY P, DEL GIUDICE P, DESJEUX P - Leishmanioses : aspects épidémiologique, clinique et biologique. *Feuilles Biologie* 2002 ; **43** : 31-9.
- 8 - De MONBRISON F, ANGEI F, STAAL A, KAISER K, PICOT S - Simultaneous identification of the four human plasmodium species and quantification of plasmodium DNA load in human blood by real-time PCR. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2003 ; **97** : 387-90.
- 9 - NICOLAS L, PRINA E, LANG T, MILON G - Real-Time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. *J Clin Microbiol* 2002 ; **40** : 1666-9.
- 10 - MOTT KE, NUTTALL I, DESJEUX P, CATTAND P - New geographical approaches to control of some parasitic zoonoses. *Bull World Health Organ* 1995 ; **73** : 247-57.
- 11 - SINGH S, SIVAKUMAR R - Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. *J Postgrad Med* 2003 ; **49** : 55-60.
- 12 - PIRMEZ C, DA SILVA TRAJANO V, PAES-OLIVEIRA NETO M *et Coll* - Use of PCR in the diagnosis of human American tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 1999 ; **37** : 1819-23.
- 13 - RODRIGUEZ N, GUZMAN B, RODAS H *et Coll* - Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J Clin Microbiol* 1994 ; **32** : 2246-52.

- 14 - PIARROUX R, GAMBARELLI F, DUMON H *et Coll* - Comparison of PCR with direct examination of bone marrow aspiration, myeloculture and serology for diagnosis of visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *J Clin Microbiol* 1994; **32** : 746-9.
- 15 - RAVELS, CUNY G, REYNES J, VEAS F - A highly sensitive and rapid procedure for direct PCR detection of *Leishmania infantum* within human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Trop* 1995; **59** : 187-96.
- 16 - MURRAY HW, BERMAN JD, DAVIES CR, SARAVIA NG - Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; **366** : 1561-77.
- 17 - SILVA ES, GONTIJO CMF, MELO MN - Contribution of molecular techniques to the epidemiology of neotropical *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2005; **21** : 550-2.
- 18 - WORTMANN GW, ROMERO LI, PAZZ HM *et Coll* - Real-time polymerase chain reaction diagnosis of leishmaniasis in Panama from both fresh and frozen tissue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004; **98** : 148-51.
- 19 - MARY C, FARAUT F, LASCOMBE L, DUMON H - Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR. Assay with High Sensitivity. *J Clin Microbiol* 2004; **42** : 5249-55.
- 20 - PENNISI MG, REALE S, GIUDICE S L *et Coll* - Real-time PCR in dogs treated for leishmaniasis with allopurinol. *Vet Res Commun* 2005; **29 Suppl** : 301-3.
- 21 - OSMAN OF, OSKAM L, ZIJLSTRA EE *et Coll* - Evaluation of PCR for diagnosis of visceral leishmaniasis. *J Clin Microbiol* 1997; **35** : 2454-7.

Le Workshop du CESH Réunir les bailleurs de fonds et les acteurs de l'humanitaire 9 Juin 2006 - Lyon

Le CESH organise un Workshop qui réunira 30 experts internationaux de l'action humanitaire. Il propose d'approfondir les mécanismes d'anticipation, de prédiction des crises humanitaires et d'élaboration des stratégies de financement qui s'appuient sur la capitalisation des expériences collectées sur le terrain et l'utilisation des NTIC (nouvelles technologies de l'information et de la communication) dans les actions de prévention des crises au niveau local.

- Entre urgence et développement, quelle est la place de la mitigation ?
- Quels rôles pour les Etats, les ONG, les bailleurs de fonds et les acteurs de terrain dans les stratégies d'évitement des crises humanitaires ?
- Quels financements pour la mitigation ?

Tels sont les enjeux de ce Workshop.

Le WORKSHOP du CESH Anticiper et prévoir les crises humanitaires d'urgence : vers quelles stratégies de financement ?

Renseignements et inscriptions : www.cesh.org