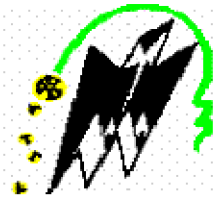
REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITÉ MOULOUD MAMMERI DE TIZI-OUZOU
FACULTE DES SCIENCES BIOLOGIQUES ET DES SCIENCES AGRONOMIQUES
DEPARTEMENT DE BIOCHIMIE ET MICROBIOLOGIE



Mémoire de fin d'étude

En vue de l'obtention du diplôme de master en biologie

Spécialité : Microbiologie Appliquée

Thème

Etude sérologique par immunofluorescence indirecte de la leishmaniose viscérale en Kabylie

Réaliser par **:**
Melle : HADJAB Katia
Melle : MAMOU Radia

Soutenu le 22 JUIN 2015 devant le jury :

Mr BOUKHAMZA	Professeur	UMMTO	Président et examinateur
Dr MOULOUA	M.C.B	UMMTO	Promoteur
Mm AOUAR	M.C.A	UMMTO	Examinatrice
Mr AMROUN	Professeur	UMMTO	Examinateur

REMERCIEMENTS

Nous tenons d'abord à remercier Dieu le tout puissant, omnipotent et miséricordieux, de m'avoir donné de la force et de la volonté le long de mes 5 années à l'université.

Nous tiendrons tout d'abord à exprimer notre profonde gratitude et nos sincères remerciements :

Les membres de *jury* :

Pr BOUKHAMZA

Dr AOUAR

Pr AMROUN

D'avoir accepter d'examiner ce modeste travail.

A Dr MOULOUA pour nous avoir fait l'honneur de nous encadrer, pour sa participation active à la création de ce mémoire, pour ses conseils et son orientation qui nous a beaucoup aidés, pour la confiance et la liberté qu'il nous a accordée tout au long de la réalisation de ce mémoire et d'avoir mis a notre disposition le matériel nécessaire pour les travaux effectués. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de nous vifs remerciement.

A Dr SEKLAOUI pour la confiance et la liberté qu'elle nous a accordée tout au long de la réalisation de ce mémoire et d'avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour les travaux effectués.

A Dr AFROUN, qui nous a aidés dans notre stage et qui a contribué activement à la réussite de ce travail.

Nous tenon aussi à remercier, l'ensemble du personnel du service d'Eco-épidémiologie et Centre National de référence des Leishmania, de l'Institut Pasteur d'Algérie, notamment : Pr HARRAT, Mmes MZAI GHANIA, Mmes KHERACHI IHCENE.

Enfin nous remercions tout le personnel de laboratoire de Parasitologie, microbiologie et sérologie.

DEDICACE

JE Dédie cet humble travail

A mes très chers parents qui m'ont soutenu le long de mon parcours

A mes très chers sœurs : Hanane et Lynda

A mes chers frères : Farid et Lyes

A toutes la famille : Hadjab, Sersour, Mamou.

A toutes mes amies

A tous mes camarades de promotion

KATY

DEDICACE

JE Dédie cet humble travail

A mes très chers parents qui m'ont soutenu le long de mon parcours

A mes très chers sœurs : chabha et nadia.

A mes chers frères : Syphax et Juba.

A toutes la famille : Mamou, Temam, Haddag, Hadjab, Bourbass.

A toutes mes amies

A tous mes camarades de promotion

RADIA

Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AEH : Ain El Hammam

ARN : Acide Ribonucléique

CHU : Centre Hospitalo-universitaire

DEM : Draa El Mizane

ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

IFI : Immunofluorescence Indirecte

IPA : Institut Pasteur d'Algérie

L : *Leishmania*

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM 2 : mésoblastique avec différenciation

LAM 3 : promyélocytaire

LAM 4 : myélomonocytaire

LAM 6 : érythroblastique ou érythroleucémie

LAM : Leucémie aiguë mésoblastique

LC : Leishmaniose cutanée

LCD : Leishmaniose cutanée diffuse

LCM : Leishmaniose cutanéo-muqueuse

LCS : Leishmaniose cutanée sporadique

LCZ : Leishmaniose cutanée zoonotique

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LV : Leishmaniose viscérale

LVA : Leishmaniose viscérale de l'adulte

LVH : Leishmaniose viscérale humaine

MM : Myélome Multiple

MGG : May Grunwald Giesma

MON : Désignation du laboratoire de l'université 1 de Montpellier

NNN : Novy-Mac Neal-Nicolle

OMS : Organisation mondiale de la santé

P : *Phlebotomus*

PBS : Phosphate Buffer Solution

Liste des abréviations

PCR : *Polymerase chain reaction*

pH : Potentiel Hydrogène

SRM : Système Réticulo-Histiocytaire

T-O : Tizi-Ouzou

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

µm : Micromètre

SOMMAIRE

Résumé

Abstract

Introduction.....01

Partie théorique

Chapitre I : Généralité sur les leishmanioses

I. Généralités 3
II. Historique 4
III. Répartition géographique 4
IV-Protagonistes des leishmanioses 5
IV-1 Le parasite 5
IV-1-1 La classification 5
IV-1-2 Les différentes formes et localisations 8
IV-1-3 Biologie 9
IV.2 Le vecteur 9

IV-2-1 Classification 10

IV-2-2 La morphologie 10

IV-2-3 la biologie 11
IV-3 Les hôtes réservoirs 11
IV-4 Interaction *leishmania* –vecteur 12
IV-5 le cycle biologique 12
V- Clinique 13
V-1 Leishmaniose viscérale indienne ou kala azar 13

V-1-2 Leishmanioses viscérale adulte en Algérie 14
V-1-3 Leishmaniose viscérale infantile en Algérie 14
V-2 Leishmaniose cutanées 15
V-2-1 Leishmaniose cutanées localisée 15
V-2-2- Leishmaniose cutanées diffuse 16
V-2-3 Leishmaniose cutanéomuqueuse 16

VI – Diagnostic biologique de la LV 17

VI-1 Diagnostic biologique 17
VI-1-1- Diagnostic parasitolgique 17

VI-1-2 Diagnostic moléculaire 18
VI-1-3 Diagnostic immunologique 18
VII. Traitement 19
VIII- Prophylaxie 21

Partie pratique

Chapitre II : Présentation de la région d'étude

I. Matériels et méthodes 23
II. Etude rétrospective de la LV dans la région de Tizi-Ouzou entre 2007 et 2014 23
III. Séro évaluation de la LV dans la région de Tizi-Ouzou durant la période d'étude 23

I- 3 Matériel de laboratoire 24
I.3.1Grands matériels 24
I-3-2 Petits matériels 24
I-3-3 Réactif 24
I-4 Méthode 25

I-4-1 Préparation des milieux de culture pour la sensibilisation des lames 25
1- Milieu de culture Novy-Mac Neal-Nicolle(NNN) 25
2- Milieu CCS (Cœur Cerveau Sang) 28
I-4-2 Diagnostique de la leishmaniose viscérale 29
I-4-3 Prélèvements sanguins 30

1.4.4. Méthode d'étude 30

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Résultats 33
I.1 Etude rétrospective des résultats obtenus au niveau de la Direction de la santé publique de Tizi Ouzou entre 2007-2014 33
I.2. Etude Séro évaluation de la LV dans la région de Tizi Ouzou durant la période d'étude 35

II. Discussion 37

II.1 Etude rétrospective de LV à Tizi-Ouzou 37

II.2 Séro évaluation de la LV chez des malades immunodéprimés hospitalisés au niveau du CHU DE Tizi-Ouzou 39

Conclusion 41

Références bibliographiques

Annexes

Introduction

Introduction

Les leishmanioses sont des protozoose infectieuses touchant un grand nombre d'animaux vertébrés dont l'homme et le chien. Elles sont dues à la multiplication, au sein des cellules du système des phagocytes mononuclées, de parasites appartenant au genre *leishmania.* Ces protozoaires sont transmis à l'hôte vertébré par l'intermédiaire de diptères psychodidés du genre *Phlebotomu*s dans l'Ancien Monde et *Lutzomyia* dans le Nouveau Monde (DEDET, 2009).

Chez l'homme, les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays du monde et l'on considère qu'elles menacent 350 millions de personnes. En Algérie les leishmanioses sont de deux types : la leishmaniose viscérale dont le réservoir animal est le chien et la leishmaniose cutanée zoonotique. Il y a eu trois recensements de la forme viscérale : entre 1965-1975 ,497 cas, entre 1975 -1984 ,700 cas et enfin entre 1985 et 1990, plus de 1200 cas (HARRAT *et al*, 1995).

La Kabylie est connue depuis longtemps comme étant le foyer le plus actif de la leishmaniose viscérale et de la leishmaniose cutanée sporadique, (DEDET *et al*, 1997). Il faut noter que le foyer regroupe à lui tout seul prés de 50% des cas leishmanioses viscérales recensées (HARRAT *et al*.1995). Ceci peut s'expliquer par le fait que la Kabylie présente une très grande géodiversité, avec des portions très contrasté ,aussi bien du point du vu bioclimatique ,géomorphologique que végétationnel, offrant ainsi des biotopes très diversifiés pour les différentes espèces de phlébotomes (MOULOUA,2014).

La méthode classique pour diagnostiquer les leishmanioses est l'identification du parasite à l'intérieur des macrophages de patients pour la leishmaniose viscérale, le diagnostic est réalisé par ponction de moelle osseuse. Cette technique est invasive est très mal supportée par les patients et demande un personnel qualifié.

Pour cela la détection du parasite par des techniques moins agressives pourrait faciliter le diagnostic, ainsi la recherche d'anticorps dans le sérum des patients par Immunofluorescence indirect peut s'avérer plus rapide, moins invasif que la ponction.

Quant à la leishmaniose dermique le diagnostic se fait par un examen direct à partir de prélèvement cutanée et par ensemencement sur un milieu de culture approprié.
Les objectifs de ce travail sont, d'une part de faire le point sur la prévalence de la leishmaniose viscérale en Kabylie, d'autre part la mise au point d'une technique de diagnostic sérologique de la LV : l'Immunofluorescence indirect et l'évaluation de la séroprévalence de la leishmaniose viscérale chez les immunodéprimés hospitalisés au niveau du CHU de Tizi Ouzou.
Notre travail s'articule autour de quatre chapitres : le premier présente une revue bibliographique sur l'historique et les généralités sur les leishmanioses.
Le second chapitre consiste à présenter le matériel et les méthodes utilisées, il est divisé en deux parties, dans la premier partie, nous parlerons de notre enquête auprès des services de santé (service Hématologie et service pédiatrie hématologie) pour recueillir des

renseignements sur les malades hospitalisés, la deuxième partie c'est la mise en place d'une technique sérologique qui est l'Immunofluorescence indirecte.

Le troisième chapitre rassemble les résultats obtenus au cours de notre travaille.
Le quatrième et dernier chapitre est consacré à la discussion des résultats que nous avons obtenus au cours de notre stage. Enfin une conclusion générale mettant l'accent sur l'importance des leishmanioses en santé public.

Chapitre I
Généralités
sur les leishmanioses

I. Généralités

I.1 Définition

Les leishmanioses sont des antropozoonose dues à des protozoaires du genre *Leishmania* (MINODIER *et al.*, 1999 ;BASSET *et al.*,2001 ;DEDET et PRATLONG,2001),famille des trypanosomatidae (LIGHTBURN et al.,2000).Ce sont des maladies infectieuses dues au parasitisme des cellules mononuclées par des protozoaire flagellés (DEL GUIDICE *et al.*,2001).ces parasites obligatoire dihétéroxènes (MARIGNAC,2003) affectent de nombreuses espèces de mammifères, dont l'homme (DEDET,2001) ,auxquelles ils sont transmis par la piqure infestant d'un insecte diptère vecteur hématophage de 2 à 4 mm de long (MARTY,2002) appartenant au genre *Phlebotomu*s dans l'Ancien Monde et Lutzomyia dans le Nouveau Monde (OSMAN et al.,2000).
Chez l'homme, les leishmanioses sont endémiques dans 88 pays du monde et l'on considère qu'elles menacent 350 millions de personnes comprenant différentes formes cliniques : la leishmaniose viscérale, les leishmanioses cutanées et la leishmaniose cutanéo-muqueuse. (DEDET, 2008).

La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale, également connue sous le nom de KALA-AZAR ou de fièvre noir est la forme la plus grave de la maladie, avec une mortalité de presque 100% en absence de traitement. Il s'agit d'une protozoose constituant selon le foyer des antropozoonose (réservoir animale) ou des anthroponose (réservoir homme). (DEDET, 2001).

On décrit la leishmaniose viscérale dans 61 pays sur 4 continents où environ 350 millions de personnes sont exposées au risque. Son incidence au niveau mondial est de 500 000 cas par an dont 90% sont recensés dans 5 pays seulement (Inde, Népal, Bangladesh, Soudan, Brésil) (Marty *et al*, 2002). La LV est fréquente dans le nord des 3 pays du Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie). Dans notre pays, elle s'étend sur toute la partie nord au niveau des étages bioclimatiques humide et sub-humide. Par ailleurs, de nombreux cas ont été Signalés dans les régions semi arides et arides connus pour être des foyers de LCZ. En effet, 21 cas de LV ont été signalés par Belazzoug en 1986 à Biskra, foyer de LC. D'autres cas sont, également apparus, dans le Hoggar et Tassili N'ajjar (BELKAID, 1997).

II. Historique

En 1900, Sir William LEISHMAN eut découvert l'agent de la leishmaniose dans des frottis de la rate d'un soldat mort de fièvre en Inde, les résultats de cette découverte n'ont été publiés qu'en 1903. (TAMIMY, 2011).

La même année, Charles Donovan identifia le même parasite dans une biopsie de rate .ce parasite fut nommé *Leishmania Donovani. (*MALLORIE, 2004).

En 1904, Rogers décrit dans une culture in vitro de sang citraté des formes flagellées, probablement des promastigotes. (TAMIMY, 2011).

En 1909, Nicolle décrit *L.infantum* en Afrique du nord et en 1913, Chagas identifia la maladie, tandis que Migone retrouva le parasite, appelé L.chagasi, en Amérique du sud. Toutefois, il s'avère qu'actuellement L.chagasi appartient au même type parasitaire que L.infantum et L. Donovani. (TAMIMY, 2011).

En 1911, LEMAIRE, décrit le premier cas de leishmaniose viscérale humaine en Algérie (LEMAIRE G. 1911).

En 1921, les frères SERGENT et leur collaborateur établissent le rôle de vecteur des phlébotomes en réussissant la transmission, du « clou de Biskra » par application de broyats de femelles sur des scarifications cutanées. *(*MALLORIE, 2004).

En 1946, SARROUY rapportent le premier cas de Kala-azar infantile en Kabylie (SARROUY *et al.*1946).

La LCN *L.infantum* est décrite pour la première fois par Belazzoug et coll en 1986.

En 1990, RIOUX et ses collaborateurs présentent une nouvelle classification des *Leishmania,* basée sur les caractères biochimiques et le profile iso enzymatique des souches des différents complexes (HARRAT, 2006).

La LC à *L.Killiki* est décrite pour la première fois par Harrat à Ghardaïa en 2006.

III. Répartition géographique

La maladie affecte 88 pays : 22 dans le Nouveau Monde et 66 dans l'Ancien Monde, les pays les plus touchés par la leishmaniose viscérale sont le Bangladesh, le Brésil, l'Inde, le Népal et le Soudan (Figure 1). On y retrouvent 90% de nouveau cas annuels , quant à la leishmaniose cutanée , 90% des cas se situe en Algérie , en Afghanistan , au brésil , en Pérou , en Arabie Saoudite et en Syrie (WHO , 2000) .

On distingue deux grandes situations géographiques, l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amérique du Nord, du Sud et Centrale).

Les différentes manifestations cliniques sont observées dans les deux mondes, mais elles ne sont pas causées par les mêmes espèces de *Leishmania (*OLIVIER *et al.*2005).

Tableau 1 : La répartition géographique de la leishmaniose dans le monde (BACHI, 2006).

<table>
<tr><th colspan="2">Nombre de pays</th><th>Les pays plus touché par LV</th><th>Les pays plus touché par LC</th><th>Les pourcentages des cas</th></tr>
<tr><td colspan="2">88 pays</td><td rowspan="2">Bangladesh
Brésil
Inde
Népal
Soudan</td><td rowspan="2">Algérie
Afghanistan
Arabie saoudite
Brésil
Iran
Pérou
Syrie</td><td rowspan="2">90%</td></tr>
<tr><td>Nouveau Monde
22</td><td>Ancien Monde
66</td></tr>
</table>

IV-Protagonistes des leishmanioses :

IV-1 Le parasite

Les leishmanias sont des protozoaires flagellés appartenant à l'ordre des kinétoplastidés et à la famille des trypanosomatidés. Ils présentent au cours de leur cycle évolutif deux stades successifs distincts : le stade promastigote dans le tube digestif du phlébotome et le stade amastigote intracellulaire chez l'hôte vertébré (figure 1) (DEDET, 2009).

IV-1-1 La classification

Depuis la description de la première espèce de *Leishmania* par LAVERAN et MESNIL en 1903, le nombre d'entités taxonomique du genre leishmania n'a cessé d'augmenter pour atteindre une trentaine de taxons distincts (DEDET ,2009). La classification traditionnelle des leishmanies est basée sur le pouvoir pathogène. Les caractères morphologiques des amastigotes sont peu nombreux et ne permettent pas de distinguer les espèces les unes des autres.

Les méthodes classificatoires récentes, axées sur les caractères intrinsèques des *Leishmania* font appel aussi bien à l'activité qu'aux structures du génome parasitaire (RIOUX *et al*, 1990). Elles ont prouvé leur efficacité dans la classification des parasites. En effet, depuis les années soixante-dix, les leishmanies ont pu être identifiée avec assez de précision au moyen de l'analyse électro phorétique des iso enzymes, formant ainsi une population homogène ou zymodème. (RIOUX *et al,* 1990).

Ainsi l'approche classificatoire, l'objet à classer est précisément le zymodème, et les variables sont les systèmes enzymatiques étudiés qui sont au nombre de 15 enzymes (RIOUX J *et al.*1990). Malgré la percée des techniques moléculaires, l'électrophorèse des iso enzymes

représente encore la technique d'identifications de référence permettant l'élaboration des classifications phénétiques et phylogénétiques (PRATLONG & LANOTT G 1999).

La classification du genre leishmania après LEVINE et al .1980 est la suivante (LEVINE *et al,* 1980).

Règne……..PROTISTA

Sous-règne……PROTOZOA

Phylum ……..SARCOMASTIGOPHORA

Sous-phylum……MASTIGOPHORA

Classe……..ZOOMASTIGOPHORA

Ordre…… KINETOPLASTIDA

Sous-ordre……..TRYPANOSOMASTINA

Famille…….. TRYPANOSOMASTIDEA

Genre …… LEISHMANIA

Figure 1: Répartition géographique des zones d'endémie de leishmanioses cutanées, cutanéo-muqueuse et viscérales (d'après Handman, 2001).

Tableau 2 : Espèces et sous-espèces de *Leishmania* dans le monde. (ROBERTS & JANOVY, 2000).

Parasite	Localité
Sous-genre *Leishmania* (Ross, 1903)	
Complexe *L. Donovani*	
L. donovani (Laveran et Mesnil, 1903)	Inde, Chine, Bangladesh
L. archibaldi (Castellani et Chalmers, 1919)	Soudan, Éthiopie
Complexe *L. infantum*	
L. infantum (Nicolle, 1908)	Centre nord de l'Asie, nord-ouest de la Chine, Moyen-Orient, sud de l'Europe, nord-ouest de l'Afrique
L. chagasi (Cunha et Chagas, 1937)	Amérique du Sud et Centrale
Complexe *L. tropica*	
L. tropica (Wright, 1903)	Milieux urbains du Moyen-Orient et de l'Inde
L. killicki (Rioux, Lanotte et Pratlong, 1986)	Tunisie
Complexe *L. major*	
L. major	Afrique, Moyen-Orient, Asie soviétique
Complexe *L. gerbilli*	
L.gerbilli (Wang, Qu et Guan, 1973)	Chine, Mongolie
Complexe *L. arabica*	
L. arabica (Peters, Elbihari et Evans, 1986)	Arabie Saoudite
Complexe *L. aethiopica*	
L. aethiopica (Bray, Ashford et Bray, 1973)	Éthiopie, Kenya
Complexe *L. mexicana*	
L. mexicana (Biagi, 1953)	Mexique, Belize, Guatemala, centre sud des États-Unis
L. amazonensis (Lainson et Shaw, 1972)	Bassin Amazonien, Brésil

L. venezuelensis (Bonfante-Garrido, 1980)	Venezuela
Complexe *L. enrietti*	
L. enrietti (Muniz et Medina, 1948)	Brésil
Complexe *L. hertigi*	
L hertigi (Herrer, 1971)	Panama, Costa Rica
L. deanei (Lainson et Shaw, 1977)	Brésil

IV-1-2 Les différentes formes et localisations

Les leishmanies se présentent chez leurs hôtes successifs sous deux stades morphologiques :

Les formes amastigotes : nichent à l'intérieur des macrophages de mammifères, au sein des vacuoles dites parasitophores. Elles mesurent de 4µm de long et 2µm de large. Les amastigotes sont également munis d'un flagellé mais celui-ci est très court et ne dépasse pas le corps cellulaire, le kinétoplaste est le plus souvent juxta-nucléaire. (MAZELET ,2004).

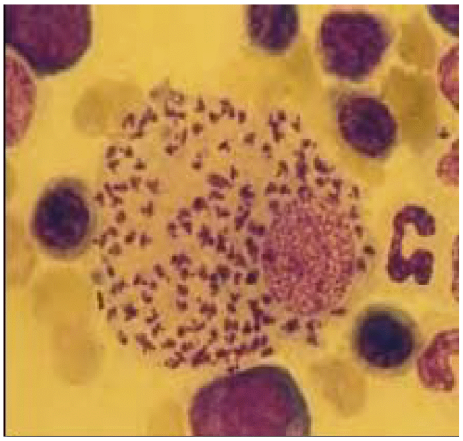


Figure 2 : Nombreuse forme amastigotes dans un macrophage (MAZELET ,2004).

Les promastigotes : sont des formes extracellulaires mobiles vivant dans le tube digestif de la femelle phlébotome. Ils présentent un corps plus au moins fuselé de 5 à 20µm de longueur et de 1 à 4µm de largeur prolongé par un flagelle qui peut atteindre jusqu'à 20µm longueur et qui émerge de leur pole antérieur . Dans ces formes parasitaires, le kinétoplaste, une partie spécialisée du compartiment mitochondriale qui contient l'ADN de cet organite, est situé entre le noyau et la base du flagelle (MAZELET ,2004).

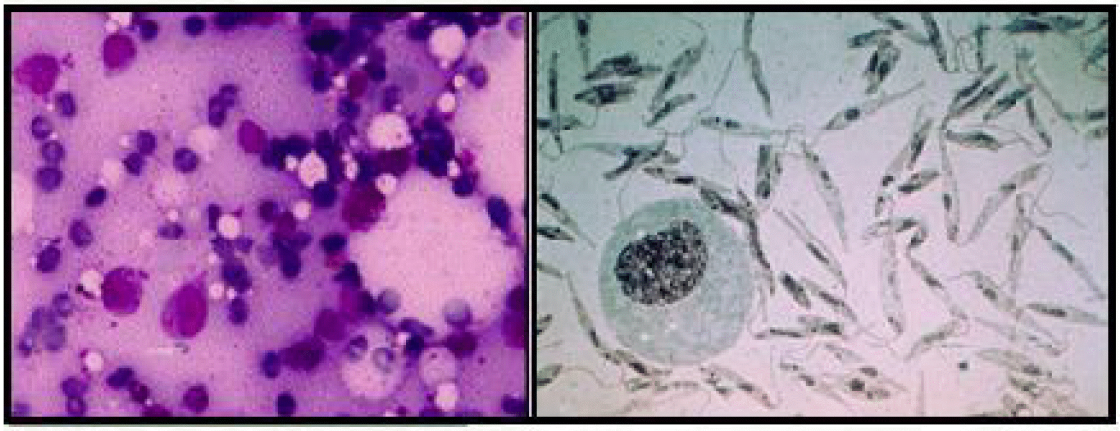


Figure 3 : à gauche les Formes promastigotes de Leishmania et à droite Présence de nombreuses leishmanies, dans leur forme amastigote, en intra et extracellulaire (MGG×100). (OMS, 2002).

IV-1-3 Biologie :

Les *Leishmania* sont des eucaryotes unicellulaires pourvus d'un organite spécifique aux kinétoplastidés, le kinétoplaste, situé en position antérieure.il contient deux types de molécules d'ADN, les maxi-cercles et les mini-cercles. La composition cellulaire des *Leishmania* inclue des organites plus classiques tels que le noyau, le flagelle et sa poche flagellaire ou encore l'appareil de Golgi. La membrane plasmique est composée principalement de glycolipides de haut poids moléculaire, de glycoinisitol-phospholipides de faible poids moléculaire (GIPLs) et de protéines membranaires. (MALLORIE, 2004).

IV.2 Le vecteur

Les phlébotomes sont signalés pour la première fois en Algérie par (FOLEY & LUDUC. ,1912). Les phlébotomes ont fait l'objet de très importants travaux menés à l'Institut Pasteur d'Algérie, sous la direction de Parrot et les frères Sergent (DEDET *et al.*, 1984). Des découvertes capitales concernant tant leur systématique que leur pouvoir pathogène y ont été réalisées. En 1921, le rôle du phlébotome comme vecteur des leishmanioses et transmetteur de plusieurs affections humaines et animales à été élucidé par les frères Sergent (figure 4), ils présentent un maillon important dans la transmission (DEDET, 2008).

Depuis les travaux de (PARROT *et al* ,1930), l'espèce incriminée dans la transmission de la leishmaniose viscérale à *Leishmania infantum* est *Phlebotomus perniciosus*.
Quant à la leishmaniose cutanée les espèces incriminées dans sa transmission, sont *P. papatasi* pour la leishmaniose cutanée zoonotique et *P. perfiliewi* pour la leishmaniose cutanée sporadique du nord (IZRI, 1992).

Figure 4 : Phlébotomes de *Lutzomyia* (à gauche) et *Phlebotomus* (à droite). (DEDET, 2001).

IV-2-1 Classification

Selon LEWIS *et al.* , 1977, Les phlébotomes appartiennent à :
Embranchement …… Arthropodes
Classe ……Insectes
Super ordre ……..Névroptères
Ordre ……Diptères
Sous ordre ……..Nématocères
Famille ……..Psychodidae
Sous famille ……..Phlebotominae
Genre ……Phlebotomus

IV-2-2 La morphologie

Les phlébotomes sont des insectes de petite taille de couleur pale à allure de moustiques. Leur corps est couvert d'une pilosité épaisse et les antennes sont formées de 12 à 30 articles, verticillés et munies d'organes sensoriels spéciaux. Le thorax convexe, suture mésonatale nulle. Les ailes sont lancéolées, couvertes de longs poils ; la frange du bord postérieur est parfois très longue, la nervure médiane présente 4 branches, cellule discoïdale ouverte. Au repos, les ailes sont ordinairement disposées en toit sur l'abdomen, parfois élevées, faisant un angle avec le corps (DANCESCO, 2008).
Les phlébotomes ont une activité nocturne, ils commencent à s'agiter au crépuscule à condition que la température soit suffisante (19°C à 20°C) et qu'il n'y ait pas de vent.
Certaines espèces sont attirées par la lumière, le plus souvent de faible intensité, d'autres espèces sont endophiles et pénètrent volontiers dans les maisons, les étables, etc. D'autre exophiles (DANCESCO, 2008) ; très sensibles aux courant d'air, ils ne se déplacent que par des temps absolument calmes. Leur vol est silencieux et s'effectue par bonds rapides sur les parois verticales de bas en haut lorsqu'ils sont dérangés.
Seules les femelles sont hématophages. Elles piquent et sucent le sang des animaux et de l'homme. Mais elles peuvent se nourrir également de sucs végétaux et de jus sucrés, ce que font les males exclusivement. On peut rencontrer les phlébotomes dans divers régions du globe mais quelle que soit l'altitude , le développement de leur larves terricoles, exige une température relativement constante , voisine de 28°C, une obscurité quasi complète , un

milieu nutritif formé de déchets organiques animaux ou végétaux , un calme absolus et un degré d'humidité voisin de la saturation (DANCESCO,2008).

IV-2-3 la biologie

Les phlébotomes présentent un cycle de vie holométabole, leur œuf se développent ensuite en larve sur le sol, dans les terriers, on pourra observer une pupe et enfin un imago (DEDET ,1999).

Dés leur émergence, les phlébotomes adultes cherchent à se nourrir ; Le 1er repas sanguin de la femelle est précédé ou suivi d'un accouplement avec le male, cet accouplement intervient dans les 48h qui suivent l'émergence des insectes adulte. Une fois gorgée de sang la femelle prend une brève période de repos sur un support proche avant de rejoindre un abri ou elle digère son repas. La digestion s'effectue en 3 à 10 jours et permet la maturation de 50 à 200 œufs.

Chaque œuf donne en 4 à 20 jours naissance à une larve terricole vermiforme longue de 0.5 à 4 mm dont l'extrémité caudale se termine généralement par 2 paires de longues soies subit 4 mues avant de donner une nymphe d'où émerge le phlébotome adulte. Depuis l'œuf jusqu'au stade imaginal, le développement dure 20 à 90 jours en fonction des conditions climatiques. (MAZELET, 2004).

Les phlébotomes se déplacent par vol court avec des arrêts fréquents, ils ne commencent à s'agiter qu'à la tombée du jour si la température est suffisamment élevé (19°C à 20°C), s'il n'y pas de vent et si le degré hygrométrique est élevé. Lorsqu'on pratique des analyses de contenus stomacaux, il n'est pas rare de trouver de sang de diverses origines. En effet lorsqu'un phlébotome est dérangé au cours de son repas, il peut le compléter soit en piquant aussitôt le même hôte ce qui explique certains lésions multiples de leishmanioses cutanée, soit en piquant un autre hôte. (MAZELET, 2004).

IV-3 Les hôtes réservoirs

Les leishmanioses sont principalement des zoonoses ; les réservoirs potentiels ou naturels sont des mammifères domestiques ou sauvages chez lesquels le parasite colonise les cellules du système des phagocytes mononuclées. Ces mammifères réservoirs appartiennent à divers ordres selon les espèces de *Leishmania* : les chiens, les chats, les rongeurs, les marsupiaux, l'homme *etc*. (DERREURE, 1999).

Depuis les travaux des frères Sergent en 1910, on sait que le réservoir principal de la leishmaniose viscérale en Algérie est le chien. (DEDET *et al,* en 1977). Ont montré que 11,4% les chiens de la Kabylie étaient atteints de leishmaniose, ce rôle de réservoirs par les travaux de BELAZZOUG *et al*. (1984-1985 et 1987).

Les rongeurs sauvages jouent le rôle de réservoir dans le cas de la leishmaniose cutanée zoonotique à *L.major* .Il s'agit généralement de gerbilidés (Psammomys obesus) (BELAZZOUG, 1986).

Les canidés, parmi lesquels, le chien joue le rôle de réservoir principal de la leishmaniose viscérale à *L. infantum* dans le bassin méditerranéen, en Amérique du sud et centrale, et en

Extrême Orient. Par contre le rôle du chien dans la transmission de la leishmaniose tégumentaire est assez mal connu. Cependant un suspecte fortement comme étant le réservoir des parasites dermotropes du complexe *L.infantum* (BENIKHLEF R, *et al* 2004).
Les canidés sauvages comme le chacal (BESSAD *et al*.2012). Et le renard (RIOUX &GOLVAN, 1969).ont également été retrouvés infestés. (MOULOUA, 2014).

IV-4 Interaction leishmania –vecteur

L'association vecteur-parasite est spécifique (KILLIK-KENDRICK . ,1985), la résistance d'une espèce phlébotome donnée au développement d'un parasite en particulier semble dépendre de la capacité de celui-ci à surmonter certains obstacles tels que les enzymes digestives de l'intestin médian, la membrane périthrophique entourant le repas sanguin et finalement l'excrétion du contenu de l'intestin médian suite à la digestion (SACKS ,2001).

IV-5 le cycle biologique

Les diverses espèces de *Leishmania* ont un cycle épidémiologique commun impliquant les passages alternés d'un hôte mammifère à un autre par l'intermédiaire du phlébotome vecteur.

Le cycle de la leishmaniose est un cycle hétéroxène présente deux hôtes, un hôte invertébré (le phlébotome) et un hôte vertébré (homme, chien, renard) (Figure 6).
Lors de son repas sanguin, le phlébotome femelle infecté peut injecter entre 10 et 100 promastigotes dans le derme de l'hôte vertébré, les promastigotes métacycliques vont être phagocytés par les macrophages, et se transforme en amastigotes dans ces derniers, se multiplient dans les cellules infectées et atteignent différents tissus suivant l'espèce de *Leishmania* impliquée, ceci explique les différentes manifestations cliniques des leishmanioses (MALLORIE ,2004).

Les amastigotes vont se diviser et faire éclater les macrophages pour coloniser d'autres cellules saines avoisinantes. Les phlébotomes s'infectent pendant les repas de sang quand ils ingèrent des macrophages porteurs d'amastigotes. Dans l'intestin du phlébotome, les parasites se transforment en promastigotes, se multiplient et se différencier en promastigotes métacycliques puis migrent dans les glandes salivaires (MALLORIE ,2004).

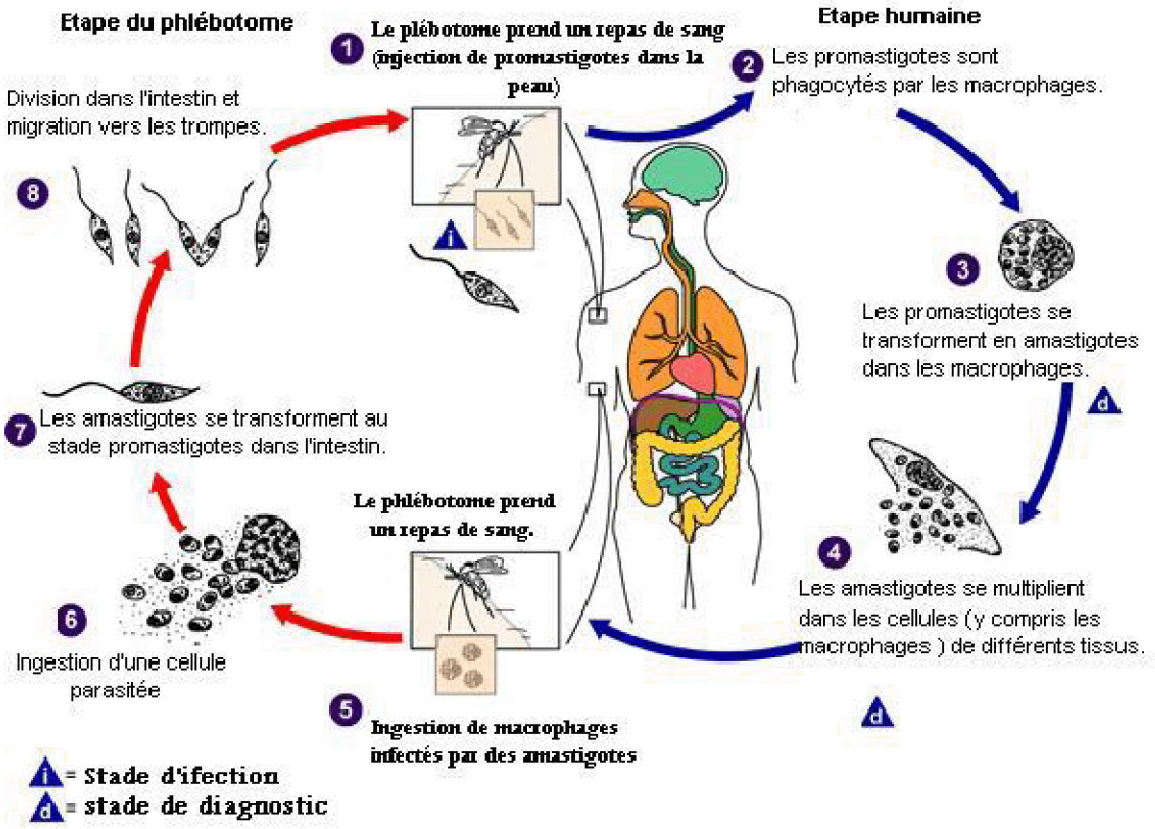


Figure 5 : Cycle de la leishmaniose cutanée et viscérale (BEN GHAZI, 2010).

V- Clinique

La plupart des leishmanioses sont zoonotiques et les hommes ne sont infectés que lorsqu'ils s'exposent accidentellement au cycle naturel de la transmission. Toutefois, dans les formes anthroponotiques (transmission d'une personne à l'autre par l'intermédiaire du phlébotome), les êtres humains sont l'unique réservoir. (MALORRIE, 2004).

Chez l'homme la majorité des infections leishmaniennes sont asymptomatiques. Toutefois, lorsque la maladie se déclare elle peut s'exprimer sous plusieurs formes plus ou au moins graves :

V-1 Leishmaniose viscérale

V-1-1 Leishmaniose viscérale Indienne

Connus anciennement sous le nom Kala-azar indien ou fièvre noire, elle est la forme la plus grave de leishmaniose. La LV due à *L. Donovani* et classiquement endémique dans certains régions de l'Inde.

V-1-2 Leishmanioses viscérale infantile

La leishmaniose viscérale en Algérie à la même distribution que la leishmaniose canine, elle s'étend sur toute la partie nord au niveau des étages bioclimatiques humides et subhumides. Par ailleurs, de nombreux cas ont été signalés dans les régions semi aride connus pour être des foyers de leishmaniose cutanée zoonotique (ex Biskra, Batna) (HARRAT *et al.*2006).

A coté des anciens foyers (Tizi-Ouzou, Boumerdes, Médéa et Constantine), de nouveaux foyers sont apparus : Annaba, Tlemcen et Oran à l'Ouest, La Chiffa et Chleff. (HARRAT *et al.*1995).

Depuis la description du premier cas en 1946 par SORROUY *et al.*, la Kabylie est considérée comme le foyer le plus actif en Afrique du Nord qui regroupe à lui seul prés de 50% des cas en Algérie (HARRAT *et al* .1992): ce foyer comprend les régions de Tizi-Ouzou, de Bouira et de Boumerdes.

La leishmaniose viscérale humaine pose un réel problème de santé publique en Algérie, on dénombre environ 400 nouveaux cas par an. Dans le foyer de Tizi-Ouzou la maladie est responsable de 6% de décès (HARRAT *et al*. 1995).

Leishmania infantum zymodème MON-1 est l'agent pathogène le plus fréquemment isolé chez les enfants atteints de leishmaniose viscérale ; il a pour réservoir le chien (BELAZZOUG, 1986) et comme vecteur principal *Phlebotomus perniciosus* (IZRI, & *al.* ,1990).

C'est une atteinte systémique de la lignée des phagocytes mononuclées, dont l'évolution spontanée aboutit généralement à la mort en un à deux ans. L'incubation est extrêmement variable, elle oscille en moyenne entre trois et six mois, mais pouvant aller jusqu'à plusieurs années ; elle semble plus courte chez les enfants.

Chez l'adulte, la maladie est généralement pauci-symptomatique, excepté chez les individus Immunodéprimés, notamment les sidéens. Chez ces patients, des localisations inhabituelles des lésions sont observées : digestives, cutanées, muqueuses, pleuropulmonaires. (AOUN *et al*. 2002).

Les surinfections bactériennes sont fréquentes. Sans traitement, l'évolution se fait sur plusieurs mois, et la mort survient par la dégradation grave de l'état général. Sous traitement spécifique les signes régressent, mais des rechutes sont de plus en plus fréquentes, notamment suite à l'émergence de souche résistante au traitement.

Une guérison obtenue après traitement ne s'accompagne pas d'une stérilité parasitaire. Le parasite persiste à l'état qui quiescent dans certains organes, y compris dans la peau saine ; ce phénomène s'accompagne, dans la plupart des cas, d'une immunité face aux réinfections, mais aussi de rechutes si l'immunité cellulaire vient à faiblir (AOUN *et al* .2002).

V-1-2-1 Leishmaniose viscérale infantile en Algérie

La leishmaniose viscérale infantile sévit dans le pourtour du bassin méditerranéen. Ce sont les très jeunes enfants, préférentiellement entre un an et 4 ans, qui sont les plus souvent atteints (MOZIANE *et al*, 1983), selon BELKAID *et al.* 1997, 90% des patients ont moins de 5 ans. Cependant, des cas de leishmaniose viscérale chez les nourrissons de 5 mois et de jeunes adolescents de 13 à 14 ans ont été enregistrés.

Le tableau clinique observé chez les malades est assez homogène avec une triade symptomatique classique associant fièvre, pâleur cutanéomuqueuse et splénomégalie .cette triade symptomatique constitue la phase d'état, précédée d'une phase incubation de durée variable (quelque jour à quelque mois, voire même les années. Le plus souvent, c'est à la phase d'état que l'enfant est présenté à la consultation dans un tableau clinique évocateur de pâleur fébrile (BACHI, 2006).

La fièvre est variable d'un enfant à au autre, dans le temps et son intensité. Elle peut être modérée, à 38°C ou éventuellement à 39°C-40°C et plus, en plateau ou son forme de pics, sans spécificité. Cela lui a valu le caractère fièvre folle. La pâleur cutanéomuqueuse est un signe constant, témoin d'une anémie importante. (BACHI, 2006).

La splénomégalie représente l'un des plus grosse rates infantiles ; de type 5, elle descend de la fosse iliaque gauche et peut même aller à la fosse iliaque droite, réalisant une morphologie en « sabot ». (BACHI, 2006).

L'hépatomégalie n'est pas constante et plus souvent modérée. Son volume peut dépasser celui de la rate. Une hépato splénomégalie important aboutit à un abdomen volumineux qui contraste avec un amaigrissement des membres, justifiant le qualificatif « d'enfant araignée ». (BACHI, 2006).

Sans traitement spécifique, l'évolution est fatale, la mort survient par surinfection et/ou hémorragie (IZRI et BELAZZOUG, 2007).

Figure 6: Aspect clinique d'enfant atteint d'une LV (TAMIMY, 2011).

V-2 Leishmaniose cutanée

C'est la forme la plus rencontrée dans le monde (BAUDRY *et al*, 2012). Selon les régions du globe et selon les différentes espèces de leishmania, la maladie présente des caractères cliniques et épidémiologiques très différents (LARIVIER, 1987).
On distingue les formes suivantes :

V-2-1 Leishmaniose cutanée localisée

C'est le classique bouton d'Orient ou autres dénominations vernaculaires en Afrique du Nord et Asie méridionale. Les espèces dermotropes sont nombreuses. Toutes les espèces anthropophiles de *Leishmania* peuvent être responsables de leishmaniose cutanée, y compris les espèces Habituellement viscérotropes comme *L. infantum*.qui peut provoquer un grand nombre d'ulcérations dermiques jusqu'à 200 dans certains cas sur les parties exposées du corps, comme le visage, les bras, ce qui entraine un grave handicap et laisse au malade des cicatrices indélébiles. (MALLORIE, 2004).

Figure 7 : leishmaniose cutanée localisée (DJEZZAR-MIHOUBI, 2006).

V-2-2- Leishmaniose cutanée diffuse

Il s'agit d'une forme LC particulière et rare .elle correspond au parasitisme par les espèces *L. aethopica* dans l'Ancien Monde et *L. amazonensis* dans le Nouveau Monde, mais depuis que les états d'immunodépression acquise se multiplient, quelque cas de LCD sont également signalés avec les espèces habituellement responsables de lésion localisées telles que *L. major* ou *L. braziliensis* voire *L. infantum*. (BACHI, 2006).

Figure 8 : leishmaniose cutanée diffuse (BACHI, 2006).

V-3 Leishmaniose cutanéomuqueuse

La leishmaniose mucocutanée, appelée espundia, est principalement causée par le complexe *L. braziliensis* et se retrouve partout entre le centre du Mexique et le nord de l'Argentine en excluant les régions montagneuses (sauf le versant sud des Andes) (WALTON *et al* ,1973).

VI – Diagnostic biologique de la LV

Le diagnostic clinique de la leishmaniose viscérale est difficile à cause des symptômes variés (DEDET ,2001).

VI-1 Diagnostic biologique

Le diagnostic de la leishmaniose viscérale repose sur la mise en évidence du parasite ou de son ADN et sur la recherche des traces immunologiques de l'infection, anticorps circulants ou hypersensibilité retardée (AUBRY, 2010).

Tableau 3 : possibilité de diagnostique selon la forme de la leishmaniose (DEDET, 2009).

Méthode diagnostique	formes cliniques		
	LV	LC	LCM
Prélèvement	-moelle osseuse -sang -rate	Bordure de la lésion	Lésion
Diagnostic parasitolgique	-frottis -culture	-Frottis -Culture	-Frottis -culture

Diagnostic moléculaire	PCR	PCR	PCR
Diagnostic immunologique	Détection d'anticorps circulant	Hypersensibilité	Hypersensibilité

VI-1-1- Diagnostic parasitolgique

Le diagnostic de certitude repose sur la mise en évidence du parasite ou de son désoxyribonucléique(ADN) à partir du matériel biologique récolté de façon variable suivant la forme leishmaniose en cause :

Prélèvements

Dans la LV c'est la ponction de moelle osseuse pratiquée au niveau du sternum ou à la crête iliaque chez le jeune enfant qui est le plus couramment utilisé. Le sang total, ou mieux la couche leucocytaire (globule blanc) sont de plus en plus privilégiés pour la PCR ou la mise en culture chez l'immunodéprimé en raison du caractère peu invasif du prélèvement.

Dans la LC, le prélèvement se fais préférentiellement au niveau de la bordure inflammatoire de la lésion, il est pratiqué par grattage au vaccinostyle ou à la curette ou par carottage à l'aide d'un tire-nerf utilisé en chirurgie dentaire ou encore sur le matériel de biopsie ; dans la LCM de lésion muqueuse est prélevé à l'aide d'une pince à biopsie (DEDET, 2009).

VI-1-2 Diagnostic moléculaire

Il s'est remarquablement développé au cours des 10 dernières années, bien que différentes méthodes moléculaires aient été successivement évaluées, ce sont des techniques basées sur la PCR qui sont actuellement les plus utilisées et consistent à identifier dans un prélèvement la présence du matériel génétique du parasite recherché (BOUVERESSE &BOURDEAUX, 2005).

Leurs avantages en effet résident dans leur très grande sensibilité et leur spécificité théoriquement quasi absolue, en outre elle permet de détecter l'ADN parasitaire dans les échantillons ou les cultures contaminées par les bactéries ou des champignons, elle assurent un résultat rapide, et offre la possibilité de réaliser sur le même échantillon, une identification de l'espèce de *Leishmania* en cause. (BOUVERESSE &BOURDEAUX, 2005).

Dans la LV, la détection par PCR sur le sang périphérique s'est révélée avoir une sensibilité très proche de 100%, ce qui évite la ponction médullaire et représente une méthode peu invasive (DEDET, 2009).

VI-1-3 Diagnostic immunologique

La LV s'accompagne d'une réponse immunitaire humorale, avec une apparition de titre élevé d'anticorps circulants, qui peut toutefois faire défaut en cas d'immunodépression.

Dans la LC et la LCM, la réponse immunitaire prépondérante est de type cellulaire, et peut être exploré par un test hypersensibilité (IZIR et BELKAID, 2007).
On utilisant les différentes techniques utilisées en sérologie : IFI, ELISA, western blot etc.
La sérologie est très utilisée dans le diagnostic de la leishmaniose. Bien que la réponse humorale spécifique soit, en règle générale, très intense avec de hauts titres en immunoglobulines, la sérologie sous-estime la prévalence de l'infection dans les zones D'endémie (ALVAR *et al.* 2004).

✓ Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte est considérée comme la méthode sérologique de référence par l'Office International des Epizooties, utilisée dans des études épidémiologiques, ainsi que pour le diagnostic et le suivi des patients (MAIA et CAMPINO, 2008).
Elle utilise des formes promastigotes de culture comme antigène et des réactifs spécifiques d'espèce (anti-IgG de chien). Le test est manuel et sa lecture subjective. Sa mise en œuvre nécessite de bonnes compétences techniques de la part du laboratoire, et le test est
Assez laborieux puisqu'il nécessite des dilutions en série. Les échantillons montrant une fluorescence verte sont considères comme positifs, alors que ceux de couleur rouge mate sont dits négatifs. Le seuil de positivité est fixe par le laboratoire, mais il est habituellement de 1/80 ou 1/100. (MAIA *et al* ., 2008).
Le test d'agglutination directe utilise des promastigotes en suspension ou lyophilises, ainsi que les échantillons de plasma ou de sérum à tester, auxquels on fait subir des dilutions sérielles. C'est le plus spécifique. (OSKAM *et al*., 1996)
Les tests ELISA est utilise aussi bien dans les laboratoires que sur le terrain, et permet d'analyser un nombre important d'échantillons en un temps court, avec des sensibilités et spécificité importantes, aussi bien chez les animaux asymptomatiques que chez les symptomatiques. (Maia, Campino, 2008 ; Solano-Gallego *et al*., 2003).

✓ La technique ELISA

Est de plus en plus employée car :

Elle est très sensible.

Elle permet de distinguer parmi les anticorps spécifique ceux qui sont des IgG et ceux qui sont des IgM (IgM dont la présence affirme le caractérerécente cours, de l'infection).

Elle permet d'apprécier l'efficacité du traitement, sur la baisse progressive du taux des anticorps.

-Les autres réactions sont d'usage moins courant :

- fixation des compléments
- hémagglutination indirecte

VII. Traitement

Le traitement des leishmanies reste difficile, en raison d'une part de la multiplication des espèces de *Leishmania* de sensibilité variable aux produits utilisés, et d'autre part du nombre restreint de produit disponibles qui sont du surcroit anciens , toxique et couteux. Enfin,

l'existence de produits dont l'efficacité n'est pas prouvée complique encore le problème. (DEDET . ,2009).

✓ Produit classique

• Antimoniés pentavalents

Les deux produits sont l'antimoniate de N-méthylglucamine (glucantime) et le stibogluconate de sodium (pentostam). Chimiquement voisins, ils ont une teneur en antimoine distincte de 8,5% pour le glucantime (85mg /ml) et de 10% pour le pentostam (100mg /ml). Leur mécanisme d'action demeure mal connu (MARC et GERARD. ,2006).

- **Amphotéricine B**

Antibiotique polyénique isolé en 1955 d'un streptomyces du sol. L'amphotéricine B est un antifongique puissant utilisé dans le traitement des mycoses systémiques. C'est un anti leishmania puissant utilisé dans le traitement des leishmanioses graves (viscérale et muqueuse) ou résistantes aux antinomies (BOUDRISSA et CHERIF, 2011).

- **Amphotéricine B complexée avec des lipides**

Trois formations sont actuellement proposées :

-L'Amphotéricine B liposomale composé de vésicules sphérique unilamellaire incluant l'Amphotéricine B dans une double couche phospholipidique comprenant du cholestérol (Ambisome®) ;

-le complexe lipidique d'Amphotéricine B avec des phospholipidique, structure rubanée de grande taille ;

-la dispersion colloidale d'Amphotéricine B en forme de disque plat (AUBREY, 2010).

- **Pentamidine**

La pentamidine est une diamine aromatique synthétisée dés la fin des années 1930.

- **Allopurinol**

Cet analogue structurel de l'hypoxanthine à la propriété de s'incorporer à l'acide ribonucléique(ARN) des leishmanioses sur lesquelles il a un effet létal (DEDET, 2009).

- **Miltéfosine**

Administré oralement, la Miltéfosine est un phospholipide alkylè originellement développé comme anti-tumoral, la Miltéfosine a prouvé son efficacité dans la leishmaniose murine expérimentale. Les effets secondaires essentiellement d'ordre digestif, sont mineurs à cette posologie (MARC et GERARD, 2006).

- **Aminosidine sulfate**

La paramomycine est un antibiotique aminoside à large spectre, proche de la monomycine employée par les auteurs soviétiques depuis de nombreuses années pour le traitement des LC. Elle s'est révélée efficace par voie parentérale (15mg /j pendant 20 jour) dans le traitement de la LV, seule ou en association avec des antimoniés (DEDET, 2001).

- **Interféron gamma**

L'interférant gamma de synthèse est utilisé pour lutter contre le défaut d'activation macrophagique, élément fondamentale du développement de l'infection leishmaniennes. Associés aux antimoniés pentavalent, il a montré une certaine efficacité dans les LV et LCM (DEDET ,2001)

VIII- Prophylaxie

- ✓ Dépistage et traitement des sujets et chiens malades.
- ✓ Lutte contre les vecteurs par la destruction des foyers par Pulvérisation d'insecticides (DDT, HCH, organophosphorés.
- ✓ Les seules mesures prophylactiques individuelles efficaces consistent aujourd'hui en l'utilisation de moustiquaires imprégnées de pyréthrinoïdes rémanents, les seules qui ne laissent pas passer les phlébotomes.
- ✓ Lutte contre le réservoir :

Lorsque le réservoir de parasite est l'homme cela nécessite le diagnostic et le traitement des humains. Mais si le réservoir est constitué par les chiens il est préférable d'abattre des chiens errants en zone d'endémie que de faire le diagnostique (clinique et sérologique) des chiens parasités et leur traitement.

Le traitement des chiens est long, difficile et couteux, il risque de sélectionner des souches de leishmanies résistantes aux antimoniés.

Dans le cas ou le réservoir est constitué par des animaux sauvages, il est pratiquement impossible d'éliminer ces animaux, il conviendra de les éloigner de l'homme.

Pour cela il est conseillé de labourer profondément et d'installer une ceinture de champs cultivés autour des habitations. Complétés par un canal d'irrigation périphérique large de 5 à 7 m .par ailleurs le déboisement des forêts autour des habitations humaines doit être fait.

Chapitre II

Présentation de la région d'étude

Matériel et méthodes

Présentation de la région d'étude

Notre étude a été réalisée au sein du laboratoire de parasitologie de la faculté de médecine de Tizi-Ouzou et des services d'hématologie, et de pédiatrie du CHU Nedir de Tizi-Ouzou.

Notre région d'étude s'étend sur différentes régions réparties selon les différentes entités géographiques :

-littoral (Azzefoun).

-vallée de Sèbaou (Tizi-Ouzou, Draa Ben Khedda, Maathka, Fréha, Azazga).

-Dépression de Draa El Mizan, Boughni, Draa EL Mizan, Tizi Ghenif, Ouadia).

-Massif ancien (Larbaa Nath Irathen, Ouacif, Meklaa).

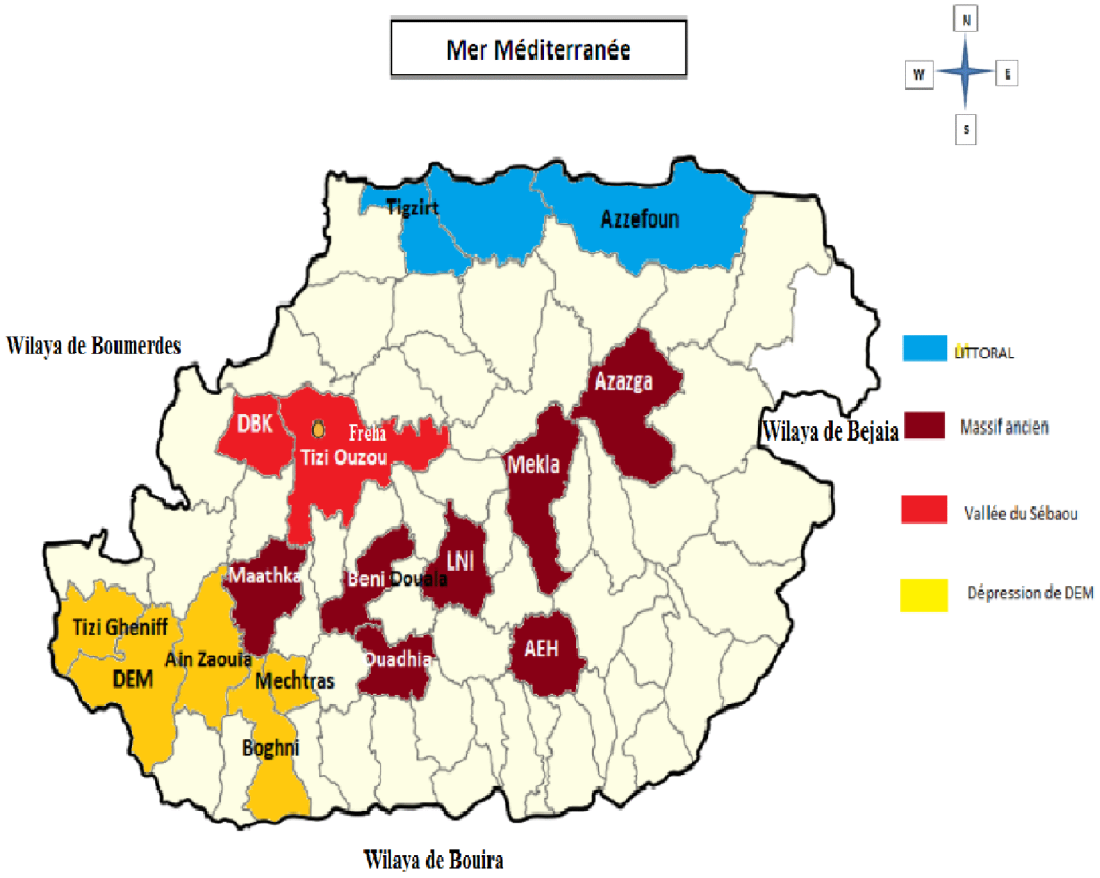


Figure 9 : Répartition des zones d'endémies des leishmanioses viscérales dans la wilaya de Tizi-Ouzou.

I. Matériels et méthodes

Notre travail comporte deux parties : une étude rétrospective de la leishmaniose viscérale dans la région de Tizi-Ouzou et une Séro évaluation de la leishmaniose viscérale chez des malades immunodéprimés hospitalisés au niveau de CHU de Tizi-Ouzou.

I.1 Etude rétrospective de la LV dans la région de Tizi-Ouzou entre 2007 et 2014

La première partie de notre travail est une étude rétrospective de la LV en Kabylie, dans laquelle nous parlerons de notre enquête auprès des services de santé pour recueillir les données relative de la LV dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Les données recueilles sont reparties en fonction de sexe, région, âge et l'année.

I-2 Séro évaluation de la LV dans la région de Tizi-Ouzou durant la période d'étude

Nous avons effectué un échantillonnage aveugle au niveau de laboratoire Microbiologie et Biochimie de CHU, on a ciblé des malades immunodéprimés issus des différentes régions endémiques hospitalisées au CHU de Tizi-Ouzou. Une fiche de renseignement précise à permis de noter pour chacun des malades outre les données cliniques et biologiques, l'origine géographique et la notion de séjour en zone d'endémie. Cette étude est effectué sur une période de 3 mois, elle à pour objectif la mise au point d'une technique d'Immunofluorescence indirecte afin d'évaluer la séroprévalence de la LV chez les Immunodéprimés, le teste à été considéré comme positif à partir du titre 1/80 et la mise au point sur le profil épidémiologique et clinique de cette affection avec une comparaison analytique avec d'autre travaux et recherches. On a fait la répartition des cas selon le sexe, région, âge et l'année.

I- 3 Matériel de laboratoire

I-3-1 Grands matériels

- Centrifugeuse
- Etuve à 25C° et 37C°
- Microscope optique
- Réfrigérateur
- Agitateur (vortex)
- Agitateur magnétique
- Microscope à UV

I-3-2 Petits matériels

- Lames
- Lamelles
- Micropipettes : P 10µl ; P 100µl ; P 1000µl ,500µl
- Bac de lavage
- Chambre Humide :(boite de Pétri en verre + éponge humide)
- Lames sensibilisés d'Ag Leishmanies (Ag figuré) (Lame de 16 puits)
- Boite de pétri
- Tubes (secs, citrates et à vis)
- Eau physiologie à 0.9%
- Bain marie
- Seringues de 10ml, 5ml
- Bec de benzène
- Embouts (1500µl)
- Embouts (150µl)
- Lames sensibilisé d'Ag Leishmania (lame de pasteur et d'importation).

I-3-3 Réactif :

- Acétone
- Glycérine
- L'eau distillée
- Chlorure de sodium
- L'eau physiologique
- Bleu d'Evans
- Bacto-agar
- Le conjuguais
- Tempon de PBS ph=7,2
- Sérum témoin positive

I-4 Méthode :

I-4-1 Préparation des milieux de culture pour la sensibilisation des lames

Selon CHANG en 1985, la culture est un complément indispensable permettant de rendre plus sensible le diagnostic parasitolgique ; d'identifier plus précisément le parasite et de tester éventuellement la sensibilité de la souche isolée aux médicaments disponibles.

1- Milieu de culture Novy-Mac Neal-Nicolle(NNN)

En 1908, NICOLLE met au point le milieu de culture de parasite *leishmania,* le milieu classique Novy-Mac Neal-Nicolle (NNN) est très utilisé mais souvent après des modifications variable d'un utilisateur à un autre. C'est un milieu diphasique avec une phase solide faite d'un culot de gélose salée avec 10% de sang de lapin et une phase liquide constitué de l'exsudat, produit de la gélose au sang dans laquelle se développent les formes promastigotes.

- **Composition du milieu NNN**
  - Bacto-Agar Difico ……..10g.
  - Na cl pur……6g.
  - L'eau distillée……1000ml.
  - Sang de lapin ……10 à 12%.

- **Préparation**

Après lavage et stérilisation de la verrerie à l'Etuve à 180C° pendant 40min. nous procédons aux étapes suivantes :

- ✓ En premier lieu, préparation de la gélose, dans un récipient, on fait dissoudre les 1,2g de Na Cl dans 500ml d'eau distillée stérile sur une flamme, puis on ajoute les 2g d'Agar à l'aide d'un agitateur on remue jusqu'à dissolution complète, on laisse bouillir pendant 3min. on transvase le mélange dans erlenmeyer (figure 11).

Figure 10: la gélose préparée (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

On précède au remplissage des tubes à vis stériles à raison de 8ml par chaque tube dans un bain marie bouillant.

Figure 11 : Les milieux gélosé au bain Marie (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

On laisse à température ambiante pour que la gélose se solidifie.

Après la solidification des milieux gélosés, on met ces derniers à l'étuve pasteur à 120°C pendant une durée de 30 min pour la stérilisation des milieux avant de rajouter le sang de lapin.

- ✓ En deuxième lieu on réalise la ponction cardiaque du lapin au laboratoire à l'aide d'une seringue 50cc. On stérilise la partie thoracique avec de l'alcool iodé.

A coté de la flamme bec benzène, on procède à la ponction cardiaque, après avoir la partie de forts battements cardiaques, et cela à l'aide d'une seringue 50cc, on prélève 20ml de sang.

Figure 12 : La ponction cardiaque du lapin (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

On refoule le sang prélevé dans un erlenmeyer, contenant 3ml de citrate de sodium à 10%. On agite pour éviter la coagulation de sang. On le met au réfrigérateur à +4°C.

Figure 13 : Recueil du sang de lapin dans l'erlenmeyer (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

- ✓ En troisième lieu, on procède au mélange de sang au milieu gélosé à raison de 1ml par tube. D'abord on met les milieux solidifiés dans un bain marie bouillant pour leur solubilisation, après on fait descendre la température à 45-50°C.

Devant, une flamme du bec benzène on mélange le sang au milieu gélosé, à raison de 1ml par tube et on remue le mélange sans faire des bulles. Ensuite on met les tubes dans un portoir incliné.

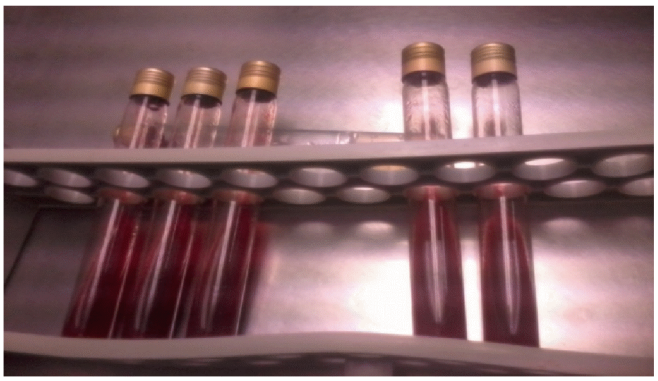


Figure14 : Inclinaison des tubes préparer (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

En dernier lieu, on met les milieux à l'étuve à 37°C pendant 24 heures pour le contrôle de stérilité et exsudation de l'eau, et cela après solidification des milieux.

Figure 15 : Etuve pasteur à 37°C **Figure 16**: milieu NNN dans l'étuve à 37°C (Laboratoire parasitologie biomédicale 2015).

Après 24 heures à T de 37°C, on constate que les milieux ne présentent aucune contamination, et il y a formation d'une phase liquide.
Puis les tubes sont placés au réfrigérateur à +4°C, les milieux se conservent pendant une durée d'un mois.

2- Milieu CCS (Cœur Cerveau Sang) :

Ce milieu est utilisé pour la culture en masse des leishmanies.

- **Composition du milieu CCS :**
  - Difco Brain Heart Infusion Agar ……26g.
  - Difco Agar Granulated ……2,5g.
  - Sang de lapin préparé soit 50 ml ……10%.
  - L'eau distillée ……500ml.
- **Préparation :**
  - Verser dans une casserole l'eau distillée ainsi que les poudres. Dissoudre à froid en remuant.
  - Chauffer le mélange et laisser bouillir environ 3mn.
  - Stériliser à l'autoclave pendant 20 minutes à 120°C.
  - Laisser refroidir jusqu'à 37°C sous la hotte et incorporer le sang de lapin dans la gélose.
  - Laisser refroidir à température ambiante. Ce milieu est conserver à +4°C.

Figure 17 : La gélose préparer (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

Figure 18 : Le milieu CCS (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).

I-4-2 Diagnostique de la leishmaniose viscérale :

Sur une période de 3 mois nous avons collecté 74 prélèvements humains ces prélèvements sont répartis sur 74 tubes citraté provenant des personnes immunodéprimé adulte et enfant hospitalisés au niveau de service hématologie et pédiatrie du CHU Nedir Mohamed de la wilaya de Tizi-Ouzou. Sur une fiche de renseignements nous avons mentionné soigneusement leur nom, prénom, âge, sexe, localisation géographique, terrain d'immunodépression y compris les signes cliniques et biologiques (voire Annexe 2).

L'objectif de notre travail est d'appliquer l'IFI pour recenser un pourcentage de sujet et analyser les résultats, et dans le but d'évaluer l'apport de l'IFI dans le diagnostique de la LVH.

- **Technique d'Immunofluorescence indirecte**
  - ✓ **Définition**

L'immunofluorescence est une technique d'immunomarquage, qui utilise des anticorps ainsi que des fluorochromes.

- ✓ **Principe**

C'est mettre en évidence la liaison Ag-AC, grâce à une anti-immunoglobuline marquée à la fluorescence.

I-4-3 Prélèvements sanguins

Un prélèvement de 5ml de sang veineux périphérique est mis dans un tube citraté puis centrifugé à 2500 tours/mn pendant 10 minutes.

Après centrifugation, 3 couches apparaissent dans le tube .les érythrocytes se déposent au fond, le plasma en surface et entre les deux couches on trouve une couche jaunâtre qui contient les leucocytes et les plaquettes.

A l'aide d'une pipette pasteur stérile, la couche leucocytaire située à l'interface plasma-culot globulaire est prélevée et ensemencé sur le milieu NNN.

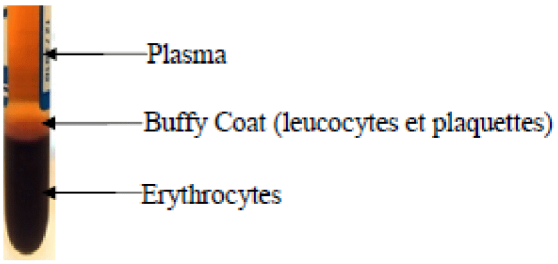


Figure 19: prélèvement sanguin sur tube citraté après centrifugation.

1.4.4. Prélèvement de sang sur tube sec

Le sang débarrassé de la fibrine est centrifugé à 2500 tours/mn pendant 5 min.

Deux couches apparaissent, le culot au fond du tube et le surnageant qui représente le sérum. Ce sérum est ensuite transféré dans un tube sec ou eppendorff et conservé au réfrigérateur à 4°C.

1.4.5. Méthode d'étude

Le sérum recueilli sert à la réalisation de différentes dilution pour effectuer le diagnostique sérologiques par l'IFI.
Les lames contenant les antigènes figurés sont préalablement mises au réfrigérateur, puis à l'étuve pendant 30 min à 37°C.
Une fixation à l'acétone à froid est ensuite réalisée pendant dix minutes et encore séchées à l'étuve pendant 30min.

En deuxième étape, on procède à la dilution des sérums : deux témoins sont utilisés, l'un positif et l'autre négatif dilués au 1/20, ceux des humains sont dilués au 1/20,1/40,1/80.
10µl de chaque dilution est déposé sur un spot.les deux premiers spots sont laissés pour les sérums témoins(le premier spot pour le sérum positif (contact AG-AC) et le deuxième pour le sérum négatif).
Les lames sont remises dans une chambre humide à l'étuve à 37°C pendant 30mn

Figure 20: incubation des lames sensibilisées dans l'étuve

Ces dernières sont ensuite lavées avec du tampon PBS pendant 5min, tremper la lame dans un bac de lavage au PBC pendant 10 min

Figure 21 : incubation des lames après lavage dans le bac de PBS

Puis séchées, Dans chaque spot on rajoute une goutte de conjugué(IgG), dilué au 1/30^{e}, on les laisse pendant 30min à l'étuve dans une chambre humide.

On lave les lames au PBS pendant 5min, tremper la lame dans un bac de lavage au PBC pendant 10 min, Puis séchées.

Ensuite on les colore avec bleu d'EVANS, puis on les remet à l'étuve pendant 20min le bleu d'EVANS sert à colorer le fond des leishmanies et masque la coloration non spécifique.

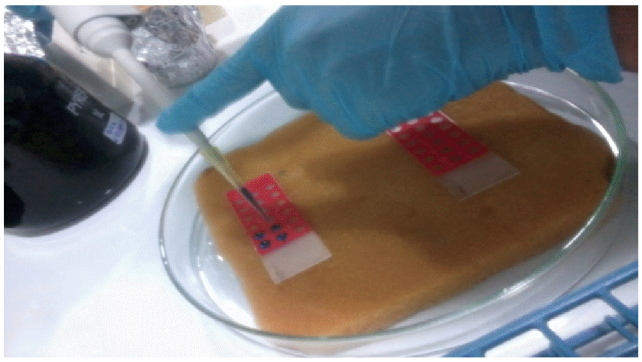
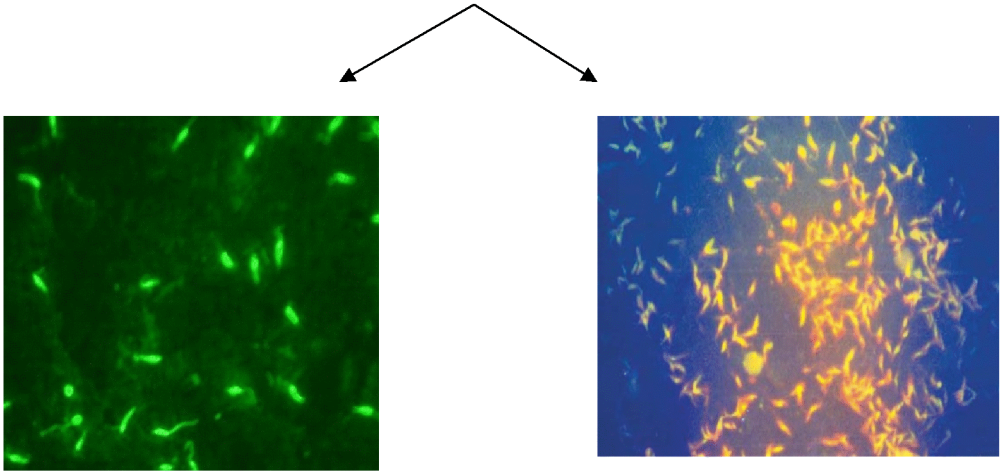


Figure 22 : Disposition des gouttes de bleu d'Evans dans chaque puits.

Les lames sont lavées au PBS et séchées à l'étuve, On ajoute quelque goutte de glycérine aux lames et on les couvre par une lamelle, et on observe au microscope à UV, Grossissement X 40.



Une fluorescence positive une fluorescence négative (HADJAB, MAMOU, 2015).

Chapitre III

Résultats et discussion

I. Résultats

I.1 Etude rétrospective des résultats obtenus au niveau de la Direction de la santé publique de Tizi Ouzou entre 2007-2014

- **Répartition des cas LV selon les années**

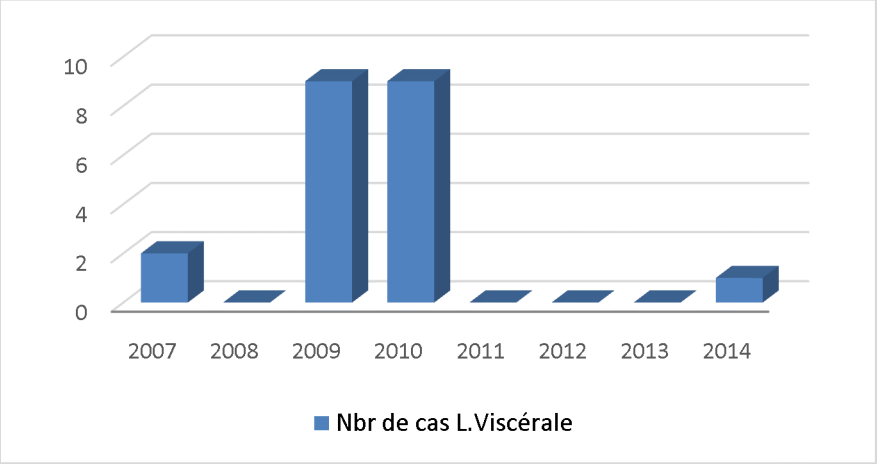


Figure 33 : Répartition des cas LV selon les années

- **Répartition des cas LV selon l'âge**

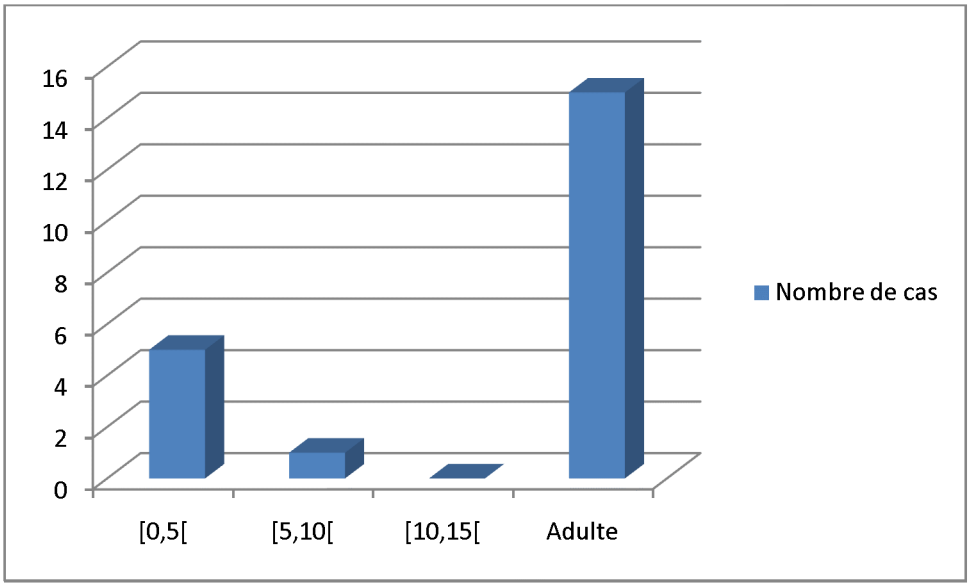


Figure 34 : Répartition des cas LV selon l'âge

➢ Répartition des cas LV selon le sexe

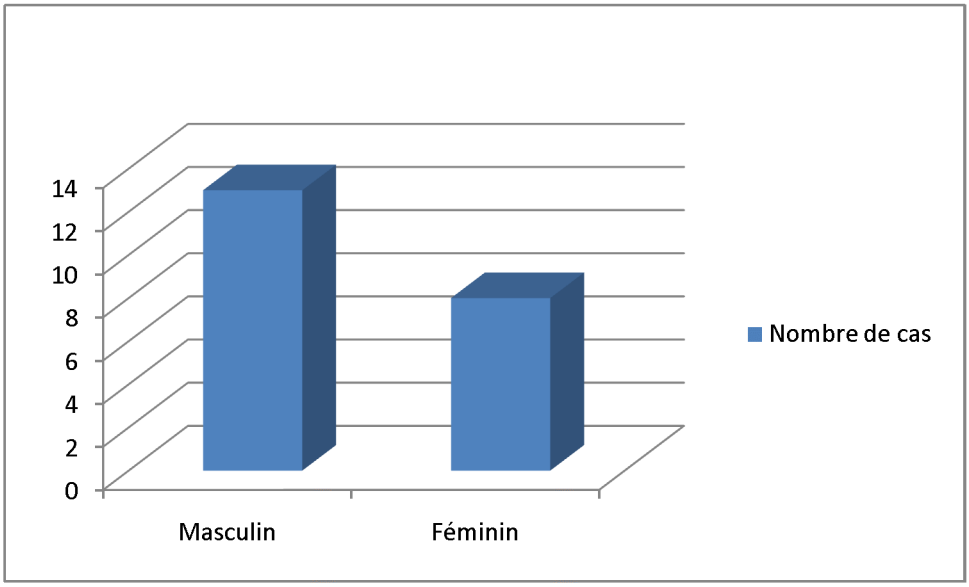


Figure 35 : Répartition des cas LV selon le sexe

➢ Répartition des cas LV selon les régions

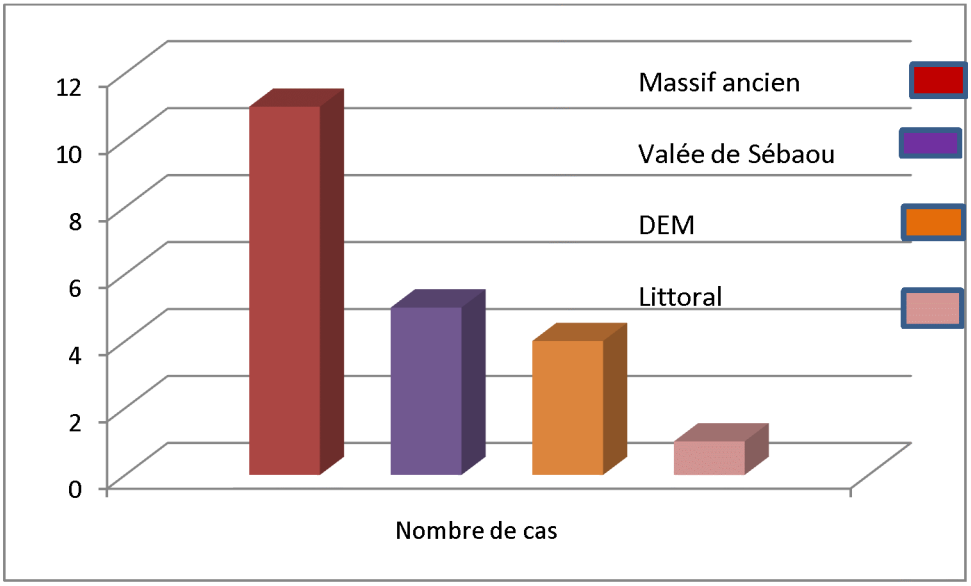


Figure 36 : Répartition des cas LV selon les régions

I.2. Etude Séro évaluation de la LV dans la région de Tizi Ouzou durant la période d'étude

➢ Répartition des cas LV selon l'âge

Durant la période d'étude, nous avons collecté 74 prélèvements provenant des personnes immunodéprimées, enfant et adultes hospitalisés au niveau des services d'hématologie et de pédiatrie du CHU Nedir Mohammed. L'âge des patients se situe dans l'intervalle de 2 à 84 ans.

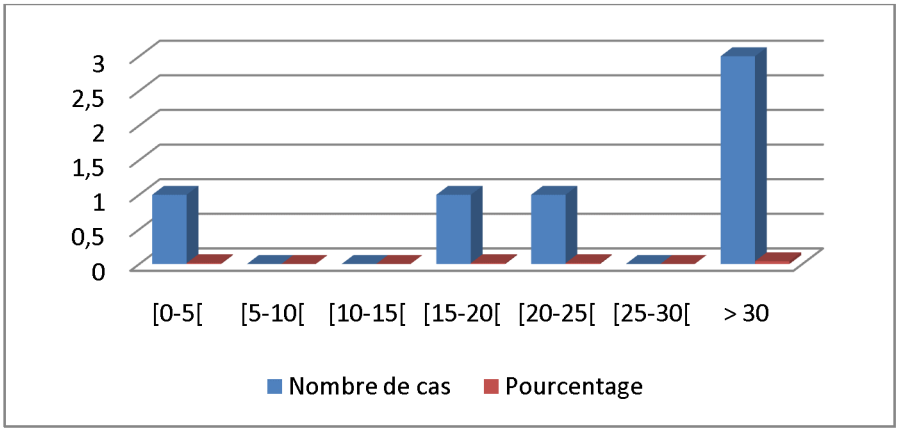


Figure 37 : Répartition des cas LV selon l'âge

➢ Répartition des cas LV selon le sexe

Parmi les 74 prélèvements collectés au niveau de CHU on a effectué un diagnostique sérologique par l'Immunofluorescence indirect qui a révélé 6 cas positif issus des régions endémique (figure), dont un est de sexe féminin (16,66%) et 5 de sexe masculin (83,33%) .

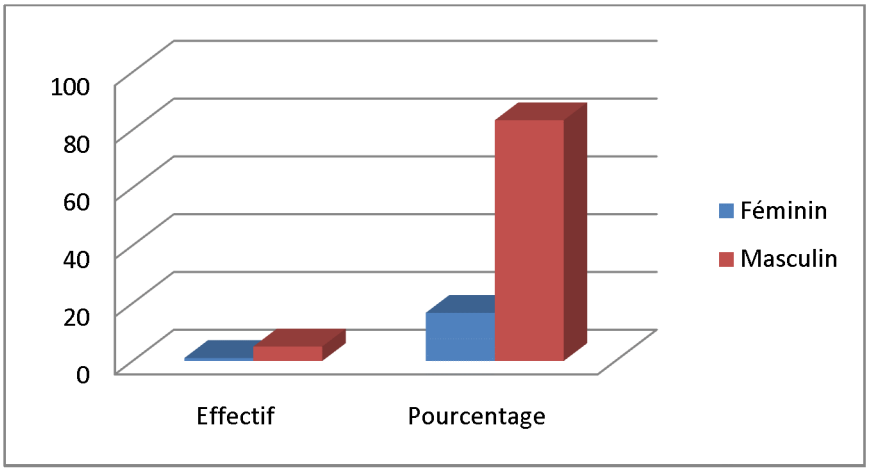


Figure 38 : Répartition des cas selon le sexe

Nous avons comparé les taux de séropositifs chez le sexe masculin et le sexe féminin par le test du X^2, le calcule nous donne une valeur de $X^2=1,108$, inférieur à la valeur seuil de 3,84 au risque

d'erreur égale à 0,05. On peut conclure qu'il n'y pas de différence significative entre séropositivité chez le sexe masculin et le sexe féminin.

➢ Répartition des cas LV selon les régions

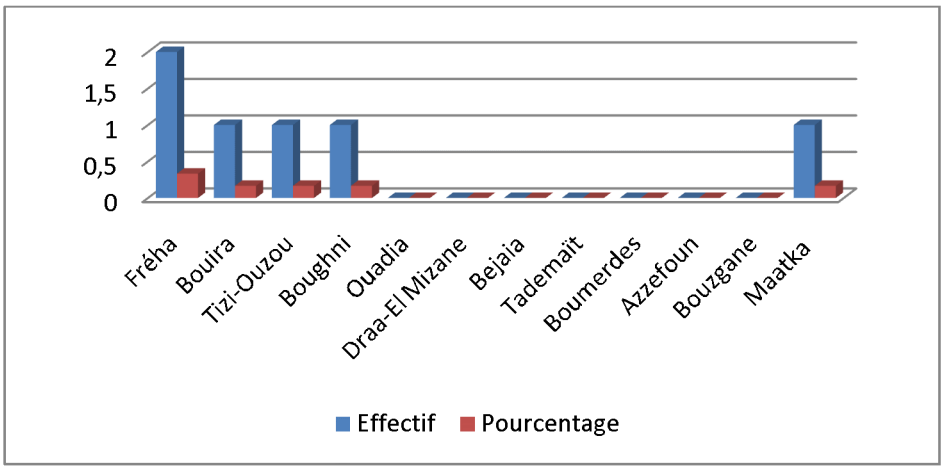


Figure 39 : Répartition des cas LV selon les régions

➢ Répartition des cas de LV selon la période d'étude

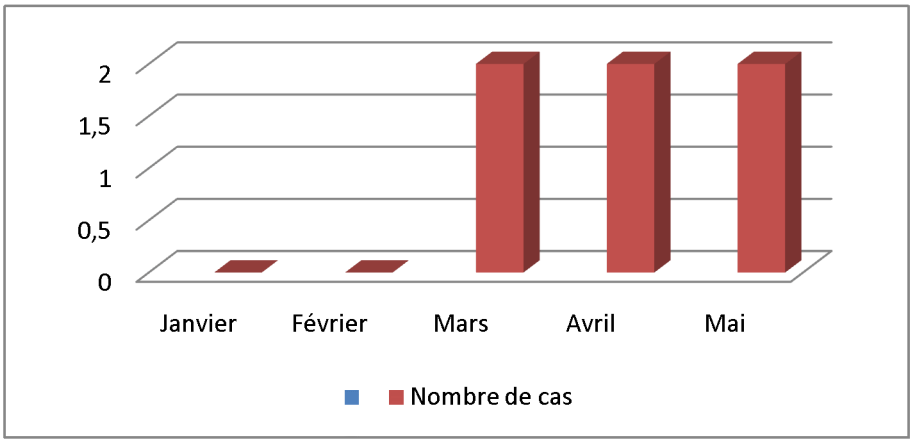


Figure 40 : Répartition des cas de LV selon la période d'étude

II. Discussion

II.1 Etude rétrospective de LV à Tizi-Ouzou

Dans la première partie dans notre travail nous avons présenté les résultats de l'enquête épidémiologique sur la leishmaniose viscérale dans la région de Tizi Ouzou à partir des données fournies par les services de la santé de la wilaya.

➢ Répartition des cas selon les années

En Afrique du Nord, la Kabylie est le foyer le plus actif de la leishmaniose viscérale et regroupe à lui tout seul prés de 50% des cas de LV (HARRAT *et al* .1995).

Dans notre enquête, le nombre de cas LV enregistré entre 2007 et 2014, soit durant une période de 7 années, est de 21 cas, si nous comparons ce chiffre aux 253 cas décrits par DEDET *et al* entre 1964 et 1976, (DEDET *et al*., 1973), aux 190 cas décrits par BELAZZOUG *et al.* entre 1975 et 1984 (BELAZZOUG *et al*. 1985) et aux 285 cas décrits par HARRAT entre 1985 et 1990 (HARRAT *et al*., 1995), nous constatons une nette diminution avec fluctuation significatives d'une année à une autre avec 9 cas en 2009 et 9 cas en 2010 et un seul cas en 2014. Cette diminution de la LV est très probablement liées à la stratégie de lutte intégrée, adoptée par l'Algérie ciblant les différentes maillons du cycle épidémiologique de la maladie et les mesures préventives (HARRAT, 1985), telles que ;

-La sensibilisation de la population à l'égard de cette maladie,
-Le diagnostic précoce et le suivi poste-thérapeutique des patients,
-La lutte contre le réservoir canin,
-La lutte contre le vecteur, par l'épandage des insecticides à effets rémanent.

Cette diminution est assez nette, si nous comparons l'incidence annuelle de la leishmaniose viscérale en Kabylie entre 2007 et 2014 à celle obtenu par d'autres auteurs les années précédentes.

Cette incidence était de 2,6/100.000 habitants entre 1965-1974 (DEDET, 1979), elle n'est plus que de 0,29/100.000 entre 2007 et 2014, ceci représente une régression importante de nombre de cas LV dans notre région d'étude.

➢ Distribution géographique

En ce qui concerne la leishmaniose viscérale, 21 cas en été enregistrés (figure 36), le Massif Ancien vient en tête avec 11 cas suivi par la vallée de Sèbaou avec 5 cas, la Dépression de Draa El Mizane avec 4 cas, vient en troisième position, ces trois entités sont les plus touchées par la LV par apport au littoral où nous n'avons enregistré qu'un seul cas. Le caractère endémique de la LV dans ces régions reviens au fait qu'elles sont caractérisées par des conditions climatiques favorisant l'apparition des phlébotomes, l'abondance d'une végétation, composé essentiellement de forêt de chêne-liège et d'oliviers. Par ailleurs, la plupart des foyers pratiquent l'élevage de bétail et de volailles pouvant jouer le rôle de réservoir à virus.

Le Massif Ancien est la zone la plus peuplée de la Kabylie, avec la plus grande densité humaine au niveau national et une forte concentration d'élevage familiaux, en deuxième position vient la vallée de Sèbaou qui est « murée » du coté Nord et Nord-est par la chaine littorale et par le massif Ancien

du coté sud, les vents marin de l'été sont des vents légers n'atteignent pas cette région car le relief les forcent à gagner des régions de plus haute altitude ces conditions sont favorables au développement des phlébotomes. En troisième position vient La dépression de DEM qui était pourtant considérée comme étant le foyer de la Kabylie où les leishmanioses à *L. infantum* est le plus actif, de par sa situation enclavée, donc protégée par rapports aux vents, avec toutefois une ouverture vers la mer au Nord - Ouest, adoucissant le climat réduisant ainsi les grands écarts de température, une altitude relativement élevée (plus de 400 m) contribue, par ailleurs à tempérer les fortes chaleurs (LESPES,1909). La dépression de DEM appartiens a l'étage bioclimatique subhumide à hivers doux (MEDDOUR, 2010), ces conditions sont favorables au développement des phlébotomes notamment les espèces liées au climat humide ou subhumide comme *Phlebotomus perniciosus* et *Phlebotomus perfiliewi (KILLICK-KENDRICK,* 1999*)*. Aussi ces facteurs géographiques et météorologiques peuvent d'une année à l'autre, en modifiant les conditions locales, favoriser ou limiter la pullulation des insectes (IZRI& BELAZZOUG ,1993). Le nombre de cas relativement peu élevé enregistré dans cette région est probablement lié au nombre total de cas de LV réduit et aussi à la forte mobilisation des services des santés et de prévention dans cette région (SEMEP de DEM). En dernière position vient le littoral qui est caractérisé par un climat subhumide à hivers doux, en effet les phlébotomes ne vivent pas sur la côte, ou salinité élevé, l'excès d'humidité et surtout, les vents souvent forts leur sont défavorable (EUZEBY, 1986).

➢ Répartition des cas LV selon l'âge

Dans notre enquête, la LV affecte plus souvent les adultes, soit 61,90% de l'ensemble des cas. Durant de nombreuses années, le profil de la maladie restait identique avec l'atteinte quasi exclusivement pédiatrique. Depuis 1980, l'épidémiologie de la maladie s'est modifiée avec survenue de l'infection chez les adultes immunodéprimés (FERNANDEZ MIRAND,1993). La recrudescence des formes viscérales dans certains pays du pourtour méditerranéen est liée d'une part à la recrudescence de la forme animale et d'autres part, à un terrain d'immunodépression (ADNAOUI,1986). Toutefois, les enfants de moins de 5 ans, avec 23.80% des cas, continuent à payer un lourd tribu à cette pathologie, cela serait en rapport avec l'immaturité des moyens de défense immunitaire, le contact étroit entre les enfants et l'animal domestique qui est le chien et la malnutrition rentre dans la ligne de compte dans les pays sous développés (GRECH *et al*., 2000 ; MIKOU *et al*., 2003). La tranche d'âge la moins touchée se situe entre 5 et 15 ans avec un seul cas constaté. Certains auteurs décrivent une affinité plus marquée du phlébotome pour le jeune enfant, ce qui explique la rareté de la maladie chez le grand enfant (DEDET, 2001).

➢ Répartition des cas LV selon le sexe

Les deux sexes sont concernés par cette parasitose. Dans la série de 2007-2014 on a remarqué une légère prédominance chez le sexe masculin (61,90%). Cette prédominance masculine est notée par beaucoup d'auteurs notamment en Afrique du Nord (LAKHDAR *et al* ., 2007) . Au Maroc une étude faite par AGOUMI *et al*., en 1989 a montré une prédominance masculine (57.7%) de même MIKKOU *et al*., 2001ont signalé cette prédominance avec 40 garçons contre 27 filles. En Tunisie, BESBES *et al.,* 1994 rapportent une prédominance masculine de 65.5%.

II.2 Séro évaluation de la LV chez des malades immunodéprimés hospitalisés au niveau du CHU DE Tizi-Ouzou

Sur les 74 sérums prélevés, 6 cas s'étaient avérés positifs à l'immunofluorescence indirecte, ce qui nous donne un taux de 8.1%. Ce taux est relativement élevé si nous le comparons au chiffre de 0.29 cas pour 100. 000 habitants, notés dans l'étude épidémiologique présentée plus haut. Ceci s'explique par le faite que tous les sérums de notre expérimentation proviennent d'individus immunodéprimés, selon DEDET (2003) la leishmaniose viscérale est une maladie opportuniste émergente dans le sud ouest de l'Europe et le pourtour méditerranéen, elle se classe en 3ème rang des infections opportuniste au cours du SIDA. Par ailleurs les sujets de notre étude proviennent de région à forte endémicité pour la leishmaniose.

➢ incidence de l'âge dans la LV chez les immunodéprimés

Durant notre étude, nous avons noté que la leishmaniose viscérale affecte plus les adultes avec 5 cas positifs dont un représente une co-infection VIH/Leishmaniose viscérale sur 6, soit un taux de 83.3%, ceci ne doit pas nous faire méconnaitre cette affection chez les jeunes enfants puisque un sérum séropositif provient d'un enfant âgé de 5 ans. Ces résultats concordent avec l'enquête épidémiologique.

Chez l'adulte, cette affection connait une recrudescence qui coïncide avec un terrain de dépression immunitaire spontanée ou iatrogène. En effet la leishmaniose viscérale à été décrite chez les malades séropositifs pour le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) aussi chez les immunodéprimées outre que le VIH comme une nouvelle infection opportuniste et doit donc évoquée en zone d'endémie au même titre que d'autres parasitoses. Sa survenu chez l'immunodéprimé est d'une particulière sévérité. Les thérapeutiques classiques sont souvent inefficaces ou n'évitent pas une rechute précoce. Aussi une thérapeutique par les immunosuppresseurs a été décrite comme favorisante d'une leishmaniose viscérale (BENELBARHDADI *et al*, 1995).

En Kabylie la LV présente un nouveau profile avec des particularités épidémio-clinique, biologiques et thérapeutiques : recrutement des cas adulte (avec 62,5% entre 2006-2010), (ACHOUR, 2010).

En France la LV touche dans 50% des cas d'adulte, par ailleurs en Tunisie la LV est prédominante chez les enfants très jeune de 1 à 5 ans (ROUANI ,2008).

Selon les données de l'OMS, collectées à partir des 17 centres de référence des Leishmanioses basés dans le sud-ouest de l'Europe (sur les 28 instructions mises en place dans 13 pays depuis 1986), l'âge moyen des patients au diagnostic de co-infection était de 38.6 ans (IC: 95% ; 38% à 39 ans ; 965 cas étudiés) dans les années 90 (1990-1998) et de 38.9 ans (IC:95%; 37.8% à 40.1 ans ; 253 cas étudiés) pour la période 2001-2006. Dans tous les cas, une nette prédominance masculine était constatée (83.2% et 88.5% respectivement). (BIEZUNSKI, 2014).

➢ Répartition des cas LV selon le sexe

Sur les 6 cas positifs que nous avons enregistrés, un seul prélèvement provient d'un patient de sexe Féminin.

Toutefois cette différence n'est pas statistiquement significative au risque d'erreur égale à 0,05. On peut conclure que le sexe n'influence pas l'infection leishmanienne. Selon CARRE *et al*. 2010 il n'existe pas une réelle différence du sexe en dehors du foyer indien ou la prédominance masculine s'explique plutôt par une plus grande exposition des hommes aux piqures que par une sensibilité particulière.

- **Répartition des cas de LV selon la période d'étude**

Durant les trois mois d'étude (du 1 Mars jusqu'à 3 Juin) on a observé l'apparition des premier cas de la LV vers la fin du printemps ce qui serait lié à la transmission saisonnière de *Leishmania infantum*, de juillet à octobre (GHRAB *et al* ., 2006). Cette affection se manifeste surtout en saison chaude (printemps, été), en relation probablement avec l'activité des phlébotomes qui est maximale durant ces saison cette hypothèse pourrait expliquer aussi l'appariation des symptômes chez ces sujets de mars à juin (ROUANI, 2008).

Conclusion

Conclusion

Au terme de cette étude, nous pouvons dire que la leishmaniose viscérale est une maladie grave et le foyer de la Kabylie est toujours actif.
Un suivi des patients admis au service d'hématologie et pédiatrie de l'hôpital de CHU Nedir Mohamed a été réalisé pour une période de trois mois. Il s'agit d'immunodéprimés pour lesquels nous avons effectué un test de diagnostic sérologiques. Pour chaque patient inclus dans cette étude, nous avons colligé l'origine géographique, l'âge, le sexe.

Les résultats de cette étude ont été complets par ceux d'une étude rétrospective entre 2007-2014, ou 21 cas positif ont été enregistrés.

Sur les 74 prélèvements, nous avons diagnostiqués, 6 sérums positifs à la leishmaniose viscérale. Ceci pourrait être en relation avec le fait que la population ciblée était immunodéprimée. Par ailleurs, le caractère opportuniste de ce type de parasite fait de lui un ennemi redoutable à craindre et à suivre de prés lors d'une association : leishmaniose et maladie immunodépressive. Ce qui ressort de l'analyse de nos résultats montre que la leishmaniose viscérale :

Touche le sexe masculin autant que le sexe féminin cela est noté dans l'étude rétrospective. Dans notre étude prospective le teste de X^2 a révélé qu'il n'y a pas de différence significative par rapport à la prédominance du sexe.

Touche les adultes autant que les jeunes enfants aussi bien sur les 6 immunodéprimés qu'au niveau de l'étude rétrospective.

La leishmaniose viscérale est en nette diminution par rapport à ce qui a été décrit dans les études précédentes. (HARRAT, 2006)

Par rapport à la distribution géographique le massif ancien est plus touché par la LV
Contrairement à ce qui était décrit par d'autres auteurs la dépression Draa el Mizane comme étant le foyer le plus actif (HARRAT ,2001).

Nous pouvons dire pour conclure que la leishmaniose viscérale est une maladie qui doit être prise en compte dans notre région de la Kabylie il s'agit d'une affection dont l'évolution spontanée est mortelle, pour laquelle il existe un traitement efficace qui assure une guérison totale et définitive dans la grande majorité des cas, et qu'il faudra penser à des mesures prophylactique qui repose et surtout sur:
-L'éradication des phlébotomes par l'usage des répulsif et d'insecticides.
-l'usage des moustiquaires à mailles serres permet la protection des personnes vivant en zone d'endémie.
-lutte contre les réservoirs du parasite par diagnostic et traitement des chiens malades.

Conclusion

La déclaration de cette maladie est obligatoire dans le but d'obtenir une cartographie de la répartition de l'endémie, de surveiller de façon documentée les foyers habituels et d'alerter en cas de foyer émergeante.

ACHOUR BARCHICHE N, MADIOU M. (2008).Recrudescence des leishmanioses cutanées : à propos de 213 cas dans la wilaya de Tizi-Ouzou. Pathologie biologie, (57): 65-70.

ACHOUR BARCHICHE N., MOULOUA2 K., BOUBIDI3 S.Ch., BENBEDKA3.S., HARRAT3.Z.Contibution à l'identification des différents maillons du cycle épidémiologique des leishmanioses en Kabylie.

ADDADI K.et DEDET (J.P) ,1976.-Epidémiologie des leishmanioses en Algérie.6. Recensement des cas de leishmaniose viscérale infantile entre 1965 et 1974.Bull.Soc.Path. Exot., 69 :68-75.

ALVAR J, CANAVATE C, MOLINA R, MORENO J, NIETO J. (2004) Canine, leishmaniasis Adv. Parasitol.57, 1-88

AOUN K, KOOLI C, BOURATBINE A, BEN ROMDHANE N, KAAROUD H, BEN MAIZ H, HADDAD A. Aspects épidémiologiques et cliniques de la leishmaniose viscérale de l'adulte en Tunisie. Méd Mal Infect **2002**,32 :387-92

AUBRYP. (2010).Leishmanioses Actualités, (198) :13-26.

AUDRYP. (2001).Leishmanioses, Actuality, (198):13-26.

BACHI F. (2006).Aspects épidémiologiques et cliniques des leishmanioses en Algérie .La lettrent de l'infectiologie. Tome XXL. 1(12):9-15.

BASSET D., PRATLONG F., RAVEL C., PUECHBERTY J., DEREURE J. & DEDET J.P. (2001). Les leishmanioses déclarées en France en 1999. *BEH* ; **5** :19-21

BAUDREY T, PATRICK K, PEYRON F. (2012).Imported cutaneous leishmaniasis in a short term traveler returning from central Mali-the role of PCR. Travel Medicine and infection Desease, (10):97-100.

BELAZZOUG S. (1984).la leishmaniose en Algérie à travers l'identification iso enzymatique des souches. Coll. Inter Tax phy des leishmania, Montpellier : 397-400.

BELAZZOUG S. (1985). Epidémiologie des leishmanioses : étude des réservoirs. Analyse chimiotaxonomique des parasites .Thèse de l'obtention du grade de docteur en science médicales.

BELAZZOUG S. Découvert d'un Mériones shawi (Rongeure, Gerbilidés) naturellement infesté par leishmania dans le nouveau foyer de Ksar Chellala (Algérie).Bull .Path. Exot.**1986** ; 105 ; 5-7.

BELKAID M., HARRAT Z. (1997). La leishmaniose en Algérie .Mise au point. Rev.Med Phar ,43-46.

BELLAZOUG S., ADDADI K., MOKRANI T., HAFIRASSOU N., HAMRIOUI B et BELKAID M. (1985).La leishmaniose viscérale en Algérie : Etude des cas hospitalisés entre 1975 et 1984.Ann.Soc.Belge.Med. 65,329-335.

BEN GHAZI ABDELKADER. 2010 LA LEISHMANIOSE VISCERALE DE L'ADULTE (ETUDE de 18 observations en médecine interne). DOCTORAT EN MEDECINE UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH.

BENIKHLEF R.., HARRAT Z., TOUJINE M., DJERBOUH A., BENDALI-BRAHAM S, BELKAID M. Présence de Leishmania MN-24 chez le chien. Med Trop **2004** ; 64 :381-383

BESSAD A.MOULOUA K.KHERRACHI I.BENBETKA S.BENIKHLEF R.MEZAT G.HARRAT Z. Leishmania infantum MON-1 isolé d'un chacal doré (Canis aureus) en Grande Kabylie (Algérie) Bull.Soc.Pathol.Exot. (**2012)**105 :5-7 DOI 10.1007/s13149-011-0182-4

BOUDRISSA A ., CHERIF K., KHERRACHI I., BENBEKTA S, (2011). Extension de L.major au nord de l'Algérie .Bactériologie ,105 : 30-35.

RESSE., BOUDREAU P., (2005) .Leishmaniose canine. Société francophone de cynotechnique : 1179.

DANCESCO P. (2008). Les phlébotomes (Diptera : Psychodidae) de Roumanie, certains aspects de leur écologie et nouvelles stations de capture. Ed. Trop.Med.Consul.Pp : 185-199.

DEDEST J-P. (2009). Leishmanies, leishmanioses ; biologie, clinique et thérapeutique, EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-506-A-10.

DEDET J-P ., (1979). BULLETIN DE L'INSTITUT PASTEUR, 77, p.49 à 82.

DEDET J-P ., (2001). Leishmanies, leishmaniose : Biologie, clinique et Thérapeutique, Encyclopédie Médico-chirurgicale :11

DEDET JP. ADDADI K.BELAZZOUG S. Les phlébotomes d'algérie.Cah.O.R.ST.O :sér.Ent.méd.et Paradol., vol. XXI-I, N°, **1984**:-99-127

DEDET J-P., (1999). Les Leishmanioses. Ed. Ellipses: 213-226.

DEDET J-P., (2008).Protozoan diseases.leishmaniasis.International Encyclopedia of public Health: 367-371.

DEDET JP., ADDADI-K., TADET DERRAZ O. (1973). Epidémiologie des leishmanioses en Algérie .Capture des phlébotomes (Diptera-Psychodidés) à Biskra, présence de sergentomyia christophersi Sinton(1927) en Algérie.Arch Inst Pasteur Alger, 51 : 183-194.

DEDET JP.ADDADI K. & LANNUZEI B. Epidémiologie des leishmanioses en Algérie. La leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. Bull.Soc.Path. Exot., **1977,** 70,250-265.

DEDET.J-P et ALVAR.J (2003): Leishmania /HIV co-infection epidemiology in Europe. Annals of Tropical medicine and Parasitology.

Del GIUDICE P., MARTY P. & LACOUR J.PH. (2001). Leishmaniose cutanée autochtone en France métropolitaine. *Ann Dermatol Venerol*, **128** : 1057-1062.

DERREURE J. Réservoir de leishmanies. In: DEDET JP, editor. Les Leishmanioses. Paris : Ellipes ; **1999**. P (109-30).

Dictionnaire de Médecine Flammarion / sous la direction de Serge Kernbaum, préface de Jean-Pierre Grünfeld.- Paris : Flammarion, 1998.-1030p.- (collection Médecine-Sciences).- ISBN 2-257-16399-0.

DJEZZAR-MIHOUBI ILHEM. (2006). Etude des leishmanioses diagnostiquées au centre hospitalo-universitaire ben Baddis de Constantine(2006).

EMNA FOURATI. (2011). Enquêtes Entomologique dans un foyer de Leishmaniose cutanée zoonotique du centre tunisien. Institut Supérieur des sciences et Technologie de l'Environnement de Bordj-Cédri.

EUZEBY J.1986 Protozoologie humaine et comparée .Tome 2,212-29

FENDRI A-H, BELDJOUDI W, AHROUS S, DJABALLAH M. (2011). les leishmanioses diagnostiquées au CHU Benhadi de Constantine (Algérie), Santé Publique, (105):46-48.

FOLEY H & LEDUC H. (1912).Phlébotome dans le sud Oranais. Accident simplement locaux dus à leurs piqures. Bill. Soc. Path exot, 5 :511-513.

GARNHAM PCC. (1965). The Leishmania with special references of the role of animal reservoir. Am. Zool., 5: 141-151

GUERIN J-P., OLLIARO P., SUNDAR S., BOELAERT M., CROFT S L.,DESJEUX P.,WASANNA M-K, and BRYCESON ADM.(2002) Visceral leishmaniasis :current status of control, diagnosis,traitement and a proposed.

HADJ SLIMANE H. (2012). Profil épidémiologique et biologique de la leishmaniose viscérale infantile dans l'ouest Algérien. Mémoire Magistére.Université D'ORAN (2012).

HARRAT Z, B.HAMRAOUI, M.BELKAID & O.TABET-DERRAZ. (1995).POINT ACTUEL SUR L'EPIDEMIOLOGIE DES LEISHMANIOSES EN ALGERIE. (1995), 88, p.180-184.

HARRAT Z, HAMRIOUI B, BELKAID M & TABET-DERRAZ O – Point actuel sur l'épidémiologie des leishmanioses en Algérie. *Bull Soc Pathol Exot*, **1995**, **88**, 180-184.

HARRAT Z. (2006).La leishmaniose canine en Algérie : Analyse épizootologique, écologique et étude du parasite. Thèse doctorale soutenue au Centre Universitaire d'El Tarf(Algérie).154p

HARRAT Z., ADADDI K. & TABET DRRAZ O. (1992). La leishmaniose viscérale en Algérie : recensement des cas de leishmaniose viscérale. Bull Soc Path Exo ; 85 : 296-301

HARRAT Z., BERROUANE Y., BEN ABDESSLEM S., BELKAID M et TABET-DERRAZ O(1992). La leishmaniose viscérale en Algérie .Evolution de la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie (1985-1990).Arch. Ins. Pasteur Algérie, 58 :255-272

HARRAT Z.BERROUANE Y. BEN ABDESSLAM S. BELKAID M. TABET-DERRAZ O. La leishmaniose viscérale en Algérie évolution de la leishmaniose viscérale dans le foyer de Grande Kabylie. Arch. Inst. Pasteur Algérie, **1992**,58 :255-272

MALLORIE HIDE. 2004 -Variabilité pathogénique du complexe Leishmania (leishmania) donovani, agent de la leishmaniose viscérale. Etude comparative des caractères biologiques, génétiques et expression génique. Thèse de docteur de l'Université de Montpellier II, juin 2004

IZRI, M.A ; BELAZZOUG, S. ; BOUDJEBLA, Y.;DEREURE, J.; PRATLONG S. ; DELALBRE-BELMONTE, A. ; RIOUX, J.A.Leishmania infantum MON-1 isolé de Phlebotomus perniciosus, en Kabylie(Algérie).Annales de parasitologie humaine et comparée **1990** Vol.65 No.3pp.151-152

IZRI A, BELLAZZOUG S. (2007). Diagnostic de laboratoire des leishmanioses rencontrées lgrie. Dossier scientique, 396:5-9.

IZRI A., DEPAQUIT J., PAROLA P. (2006). Phlébotomes et transmission d'agents pathogènes autour du bassin méditerranéen. Médecine tropicale

IZRI A., MARTY P, RAHAL A et Coll. Phlébotomus perniciosus naturellement infesté par des promastigotes à Nice(France).Bull Soc Pathol Exot **1992** ; 85 :385-7

IZRI MA., b BELAZZOUG S., PRATLONG F., RIOUX JA. (1992). Isolement de L.major chez *phlébotomus papatasi* à Biskra (Algérie) : fin d'une épopée èco-èpidèmiologique.Ann parasitol Hum Comp, 87: 399.

KLLICK-KENDRIK R., (1985), some epidemiological consequences of the e evolutionary fit between Leishmania and their phlèbotomine vectors, Bulletin of the society for pathological and exotic fillailes, 78:747-755.

LARIVIERE M, BEAUVAIS B, DEROUINE F, TRAORAR F. (1987), Parasitologie médicale .Ed. Ellipses: 57-62.

LEMAIRE G. Premier cas de leishmaniose algérienne. Bull.Soc.Path. Exot., **1911**, 4,554-563

LEVINE ND., CORLISS JO., COX G G *et al.***1980:** A newly revised classification of Protoz.27, 37-48

LEWIS D.J., YOUNG D.G., FAIRCHILD G.B., MINTER DM, (1977).Proposals for a stable classification of the Phlebotominae sandflies (Diptera: Psychodidae). Syst. Ent Pp.319-332.

LIGHTBURN E., MORAND J.J. & CHOUC C., 2000. Leishmaniose tégumentaire du nouveau monde. *Nouv Dermatol*, **19 :** 385.

M'LIKI Feriel .2010 Impacts des changements climatiques sur la leishmaniose en Algérie. Diplôme de Magistère En Ecologie Animale Université Badji Mokhtar-Annaba-.

MAIA C, CAMPINO L (2008) Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. Veterinary Parasitology, 158,274-287

MARIGNAC G., LEBASTARD M., FALL G., NICOLAS L. & MILON G. (2003). Exploration de Leishmania, un parasite deliver et prélevé par le phlébotome au niveau du derme de l'hôte vertébré. *Bull. Acad.Vét.France,* Tome, N°2, 41-45.

MARC T, GERARD W, GERVAIS R. (2006). GUIDE PHARMACO. Ed .Lamarre, (1081):816-833.

MARTY P. & ROSENTHAL E. (2002). Treatment of visceral leishmaniasis: a review of current treatment practices. *Expert Opin. Pharmacother*.

MAZELET L, (2003,2004). La leishmaniose canine dans le basin méditerranéen Français. Maitrise de la biologie des populations et des écosystèmes. Cours de l'Université Pierre et marie curie. Paris VI, 31P.

MEDDOUR R. Bioclimatologie, phytogéographie et phytosociologie en Algérie. Exemple des groupements forestiers e et pré-forestiers de la Kabylie djurdjuréenne. Thèse de doctorat d'Etat en Agronomie .Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, **2010** ;

MINODIER P, PIARROUX R., GARNIER J.M. & UNAL D. (1999). Leishmaniose viscérale méditerranéenne : physiopathologie. *Presse Med,* **28**(1) : 28-33

MOULOUA A. (2014) .Etude ECO-EPIDEMIOLOGIQUE DE LA LEISHMANIOSE CANINE EN KABYLIE .Thèse de doctorat d'Etat en vétérinaire .université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou, **2014.**

MOZIANE F., BENALIOUA M., TREBYCKA K., BOUHASS R., BELAZZOUG S., AGUERCIF M. (1983). Kala-azar chez L'enfant dans l'Ouest Algérien. A propos de 14 observations Med Hyg, 41 : 3649-50.

NICOLLE C.COMETE C. : Origine canine du Kala-azar. Bull.Soc.Path. Exot., **1908,** 1,299-301

OLIVEIRA A., FERNANDA S., CLAUDE P. (2005).PCR.Based diagnostic for detection of Leishmania in skin and blood of redents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology, (129):219-227

OLIVIER M, GREGOREY D, FORGETS G. (2005).Clinical microbiology reviews. (Preint) A, VOL.18 n°2 [244,293-305 [14pp.

OMS, (1990). Lutte contre les leishmanioses .série de rapport technique.org.Mdle santé. Genève, 176 P.

OMS, 2002- Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record.* 77, 365-372

OSKAM L, SLAPPENDEL RJ, BEIJER EGM, KROON NCM, VAN INGEN CW, OZENSOY SO, OZBEL Y, TERPSTRA WJ. (1996) Dog DAT: direct agglutination test using stabilized, freeze-dried antigen for Séro diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Immunol. Med. Microbiol.*1996, **16**, 235-239.

OSMAN O.F., KAGER P.A. & OSKAM L. (2000). Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. *Trop Med International Health,* **5** (8): 553-562.

PHILIPPE DESJEUX.2005 Actualités sur le traitement de la leishmaniose viscérale. Institute for one World Health (iOWH), 50, California Street San Francisco, USA.

PARROT L., DONATTEN A., LESTOQUARD F. Sur le de développement du parasite de la leishmaniose canine, viscérale chez P. major var perniciosus. Newstead. Bull. Soc. Pathol. Exot **1930** ; 23 :724-6

PRATLONG F. & LANOTTE G, (1999).Identification, taxonomies & phylogénèse in DETET Ed.les leishmanioses, Paris : Ellipses, 1999 :21-39.

RIOUX J. A.GOLVAN Y.J.CROSET H. TOUR S. HOUIN R. ABONNENC E.PETTIDIDIER M. VOLHARDT Y. DEDET J.P. ALBARET J.L. LANOTTE G. & QUILICI M.1969-Epidémiologie des Leishmanioses dans le midi de la France.

RIOUX J-A., LANOTTE G., SERRES E., PRATLONG F., BASTIEN P. & PERIERES J.1990: Taxonomy of Leishmania .Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification .Ann. Parasitol. Hum.65:11-125

RIPERT C. (1996).Epidémiologie des maladies parasitaires : protozoaires. Tome: 1.Ed.EMinter: 305-354.

ROBERTS L.S & JANOVY J.J.2000 –Gerald D.Schmidt & Larry S. Robert's Foundations of Parasitology.

ROUANI SIHAM. (2008) La leishmaniose viscérale infantile à Taza : étude prospective. Doctorat en Médecine UNIVERSITE MOHAMMED V FACULTE DE MEDECINE ET DE PHARMACIE-RABAT-

SACK D, and KAMHAWIS, (2001), molecular aspects of parasite-vector and vector-host interaction in leishmaniosis.Annual reviews in microbiology, 55:453-483.

SAF' JANOVA V.M, (1982). Le problème de taxonomie chez les leishmanias. In les leishmanies .Ser.Proto-zoologie, Académie Soviétique des sciences. Science, Leningrad, 7:5-109(en Russe).

SARROUY CH.COMBE P. & CLAUDE (1946).Un cas de Kala-azar infantile traité par la diamidine. Algérie, Médical.447-448

SERGENT E., PARROT L., (1926). Chronique de Bouton d'orient. Arch. Inst Pasteur Alger, 4 :26-29

SOLANO-GALLEGO L., KOUTINAS A., MIRO G., CARDOSO L., PENNISI M.G., ERRER L., BOURDEAU P., OLIVA G., (2003).

SOLANO-GALLEGO L, RODRIGUEZ A, INIESTA L, ARBOIX M, PORTUS M, ALBEROLA J. (2003) Detection of anti-Leishmania immunoglobulin G antibodies in urine specimens of dogs with leishmaniasis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**, 849–855

TAMIMY HOUDA. (2011) La leishmaniose viscérale infantile (A propos de 73 cas).Thèse de l'obtention du doctorat en médecine. UNIVERSITE SIDI MOHAMMED BEN ABDELLAH, 2011.

THELLIER M., (1995). Leishmaniose & VIH, le point sur la co-infection en 1995, prise en charge des maladies a l'hôpital de pitié Salpetrière, thèse université Paris XII-Val de marne, Faculté de médecine de Créteil, 73p.

VIDAL I, (1996). Doctrinaire Vidal.

VIDAL S.M., PINNER E., LEPAGE P., GAUTHIER S & GROS P. (1996). Natural resistance to intracellulaire in infection Nramp encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophage from susceptible (Nramp I D 169) Mouse strains J. Immunol, 57:3559-356

WALTON BC, Valver de chinel, and Equia Y Equia O, **(1973)** .Onset of Espundia after many years of occult infection with *Leishmania braziliensis* An J Trop MED Hyg 22:696-698.

WHO, W.H.O. (2000) http:/who.int/inf-FS/en/fast 116.Html.

ZAIT H, FERHANI Y; ACHIR I; HAMRIOUIB, (2012). Etude de 71 cas de leishmaniose viscérale diagnostiqués au CHU Mustapha d'Alger entre 1998 et 2009.Médecine et Maladies infectieuses, (42) :119-125.

Annexes

Annexe 1 : Le Milieu NNN (Novy-mac Neal-Nicolle)

La culture est un procède sensible, permettant le diagnostic des leishmanioses même lorsque le diagnostic direct au microscope est négatif. Le matériel parasitaire provient d'une ponction de moelle osseuse, de ganglions lymphatiques ou de rate, pour la viscérale, et de la sérosité ou du produit de raclage de lésions cutanées pour la leishmaniose cutanée.

Préparation du milieu de culture NNN

- La verrerie, soigneusement lavée, est stérilisée à l'étuve pasteur à 121 C° pendant 30 mn à 1heure.
- préparation de gélose :

- Bacto-agar Diffo 10g
- Nacl pur 6g
- Eau distillée stérilisée 1L

Mettre le Nacl dans l'eau froide et chauffer. Quand l'eau frémit ajouter le Bacto-agar et remuer avec un agitateur jusqu'a dissolution complète. Laisser bouillir 5mn.Rèpartir en tube à vis stérile à raison de 8 ml de gélose par tube.

- Prélèvement du sang de lapin par ponction cardiaque du lapin

Prendre un lapin adulte et en bonne santé, le placer sur le dos et raser les poils thoraciques. Stériliser la peau à l'alcool iodé .Repérer la zone de fort battements cardiaques et piquer l'aiguille, enfoncée en incluant à30° environ. Lorsque le sang arrive, aspirer lentement sans bouger la seringue d'un seul coup après avoir ponctionner une quantité 40ml de sang.

Le sang est immédiatement refoulé, devant une flamme. Dans un erlenmeyer contenant 3 ml de citrate de sodium à 10% et 250000 UI de pénicilline G.bien agiter le flacon d'un mouvement circulaire pour mélanger l'anticoagulant du sang.

- Mélanger du sang et la gélose

Placer les tubes de gélose dans l'eau froide et chauffer à ébullitions pour fondre la gélose. Laisse refroidir jusqu'a 45C°à 50C° et ajouter 1ml de sang par tube. Agiter sans faire de bulles. Incliner sur un portoir et laisser refroidir. Placer ensuite 24 heures à l'étuve pasteur à 37C° pour contrôle de stérilité et exsudation de l'eau. Conserver le milieu au réfrigérateur à +4C° pendant 1 mois au maximum.

Ensemencement avec précaution d'asepsie rigoureuse et mettre à l'étuve à 24C°.Attendre 7 jours avant de faire la lecture. Celle-ci se fait par l'observation microscopique, en contraste de phase, d'une goutte de la phase liquide du milieu .Placé entre lame et lamelle .repiquer ensuite sur 2 tubes de NNN.

Les leishmanies de culture sont des promastigotes, organismes allongés et mobiles grâce à un flagelle antérieur.

Annexe 2 : Fiche de renseignements

Annexe 3

Tableau 1 : Les caractéristiques cliniques des 74 malades hospitalisés.

Patients	Origine	Sexe	Age	Terrain Immunodépression
Patient 1	Fréha	M	5 ans	Leishmaniose viscérale
Patient 2	Boughni	M	23 ans	MM
Patient 3	Bouira	M	15 ans	Leucémie
Patient 4	Draa-El-Mizan	M	38 ans	LAM3
Patient 5	Ouadia	M	64 ans	LNH digestive
Patient 6	Fréha	M	10 ans	Syndrome tumoral
Patient 7	Bouira	F	2 ans	/
Patient 8	Ouadaï	F	53 ans	Diabète type II compliquée
Patient 9	Tizi-Ouzou	F	2 ans	/
Patient 10	Tizi-Ouzou	F	8 ans	Déficit immunitaire
Patient 11	Boumerdes	F	51 ans	MM
Patient 12	Bejaïa	F	25 ans	LAM2
Patient 13	Fréha	M	20 ans	LAM2
Patient 14	Tademaït	M	28 ans	LNH
Patient 15	Tizi-Ouzou (oued-aissi)	F	21 ans	LAM4
Patient 16	Bouira	F	16 ans	HDK
Patient 17	Draa-EL-Mizane	M	22 ans	HDK
Patient 18	Bouira	M	2 ans	Neuroblastome
Patient 19	Bejaia	M	44 ans	HDK
Patient 20	Bouira	M	21 ans	LNH
Patient 21	Bouira	M	56 ans	LNH
Patient 22	Boumerdes	M	57 ans	MM

Patient 23	Fréha	F	14 ans	/
Patient 24	Draa-El-Mizane	M	37 ans	LAM3
Patient 25	Bouira	F	45 ans	/
Patient 26	Tizi-Ouzou	M	3 ans	/
Patient 27	Azzefoun	F	1 an	LAN
Patient 28	Bouira	M	15 ans	LN
Patient 29	Bouzgane	M	3 ans	/
Patient 30	Azzefoun	F	1 an	LAN
Patient 31	Bouira	F	2 ans	Leucémie aigüe
Patient 32	Fréha	M	18 ans	LAM2
Patient 33	Draa-EL-Mizane	M	34 ans	LAM2
Patient 34	Bouira	F	33 ans	HDK
Patient 35	Boumerdes	F	27 ans	HDK
Patient 36	Ouacif	F	64 ans	LAM5
Patient 37	Tizi-Ouzou	M	36 ans	LAM
Patient 38	Bouira	F	22 ans	LNH
Patient 39	Boughni	M	23 ans	MM
Patient 40	Bejaïa	M	84 ans	MM
Patient 41	Boughni	M	44 ans	LAM6
Patient 42	Tizi-Ouzou	M	22 ans	LAM4
Patient 43	/	F	76 ans	/
Patient 44	/	M	51 ans	Maladie infectieuse
Patient 45	Tizi-Ouzou	M	/	/
Patient 46	Tizi-Ouzou	M	/	/
Patient 47	Tizi-Ouzou	F	8 ans	Déficit immunitaire
Patient 48	Tizi-Ouzou	M	8 mois	/
Patient 49	Tizi-Ouzou	M	11 mois	/
Patient 50	Tizi-Ouzou	M	51 ans	/

Patient 51	Boumerdes	M	61 ans	MM
Patient 52	Nacéria	M	52 ans	MM
Patient 53	Bouira	F	52 ans	LNH ?
Patient 54	Tizi-Rached	M	34 ans	/
Patient 55	Bejaïa	M	26 ans	HDK
Patient 56	Bejaïa	M	66 ans	LAM
Patient 57	Béni –douala	M	47 ans	MM
Patient 58	Boumerdes	M	61 ans	MM
Patient 59	Tizi-Ouzou	F	72 ans	LLC
Patient 60	Béni-Douala	M	58 ans	/
Patient 61	Ouacif	M	64 ans	LAM5
Patient 62	/	F	76 ans	/
Patient 63	/	M	51 ans	Maladie infectieuse
Patient 64	/	F	76 ans	/
Patient 65	/	M	51 ans	Maladie infectieuse
Patient 67	Fréha	M	5 ans	Leishmaniose viscérale
Patient 68	Boughni	M	23 ans	MM
Patient 69	Fréha	F	54 ans	/
Patient 70	Fréha	F	14 ans	/
Patient 71	Draa-El-Mizane	M	37 ans	LAM3
Patient 72	Tizi-Ouzou	M	42 ans	VIH
Patient 73	/	M	59 ans	VIH
Patient 74	Maatka	F	38 ans	Anémie, Splénomégalie

Annexe 4

Tableau 2 : **Quelques signes de certains malades sont résumés ci-dessous**

Patients	Signe clinique
Patient 1	fièvre, pâleur, splénomégalie, Thrombopénie, hypergammaglobulinémie, adénopathies.
Patient 2	fièvre prolongé, splénomégalie, adénopathie.
Patient 43	fièvre folle, pâleur, anémie
Patient 44	splénomégalie, leishmaniose cutanée
Patient 74	Anémie, Splénomégalie sévère

Annexe 5: Technique d'immunofluorescence indirecte

➢ Principe

Cette technique sérologique est basée sur la réaction Ag-Ac révélée par un réactif sous la lumière UV.

La fixation des anticorps spécifiques sur l'antigène figuré est révélée par l'adjonction d'anti-immunoglobuline marquée à l'iso thionate de fluorescéine (Rousset, 1995).

➢ Mode opératoire

Etape 1 :

Décongeler les lames sensibilisées d'Ag à partir du (- 20°C)

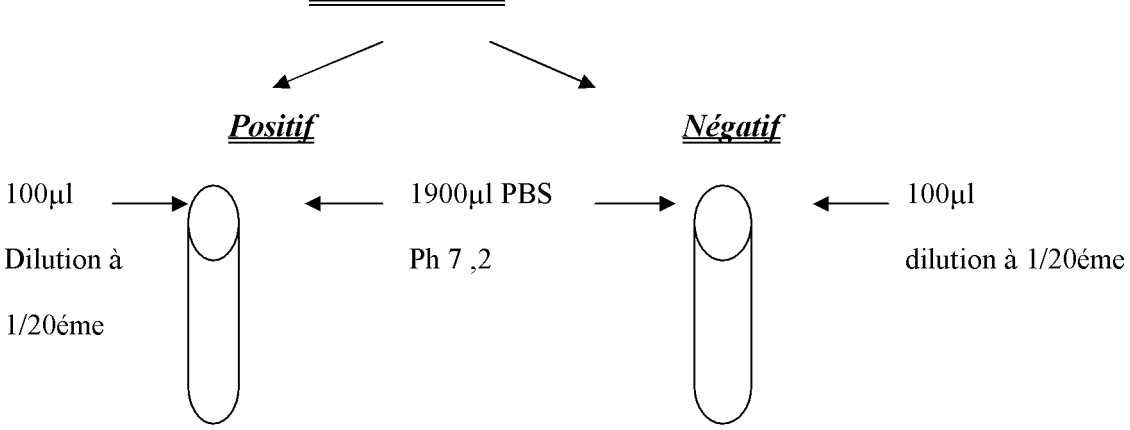
Sécher les lames à 37°C

Fixer les lames dans un bac d'acétone à (-20°C) pendant 15 min

Sécher les lames à 37°C

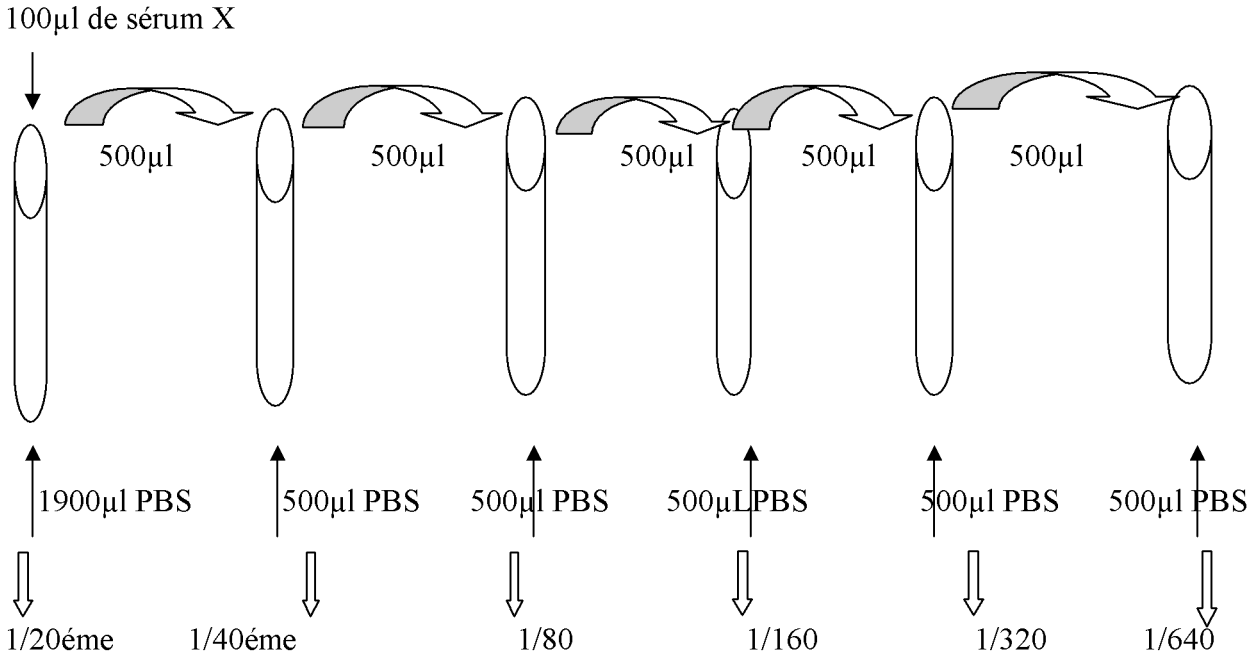
Etape 2 :

Réaliser la série de dilution à 1 /2 pour les sérums Témoin et les sérums à tester :



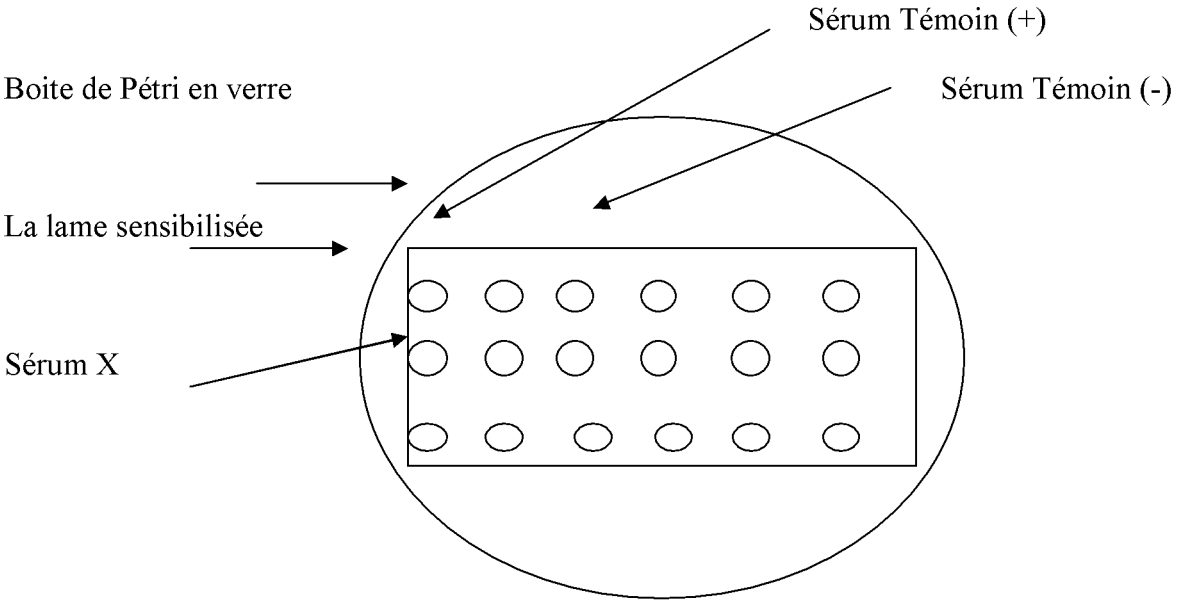
Sérum à Tester

Pour chaque sérum à tester il faut faire les dilutions suivantes :



Etape 3 :

Déposer une goutte (10µl) de chaque dilution dans le puits qui correspond de la lame



_ Incubation à l'étuve à 37°C Pendant 30 min

_ Rincer la lame au PBS à l'aide d'une pissette

_ tremper la lame dans un bac de lavage au PBC pendant 10 min

_ Sécher la lame au sèche main

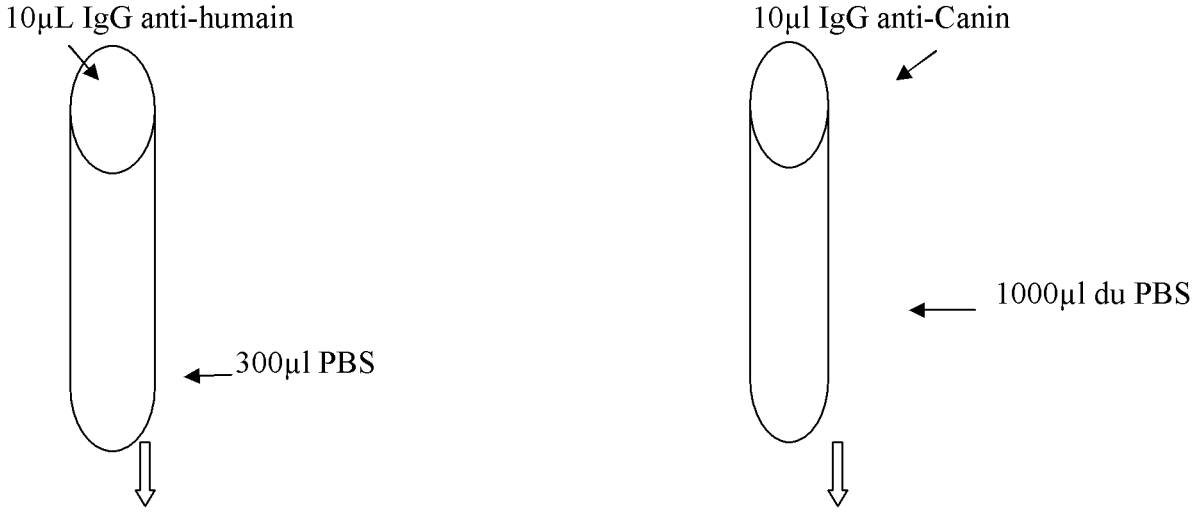
Etape 4 :

Déposer une goutte (10µl) de conjuguai fluorescent dans chaque puits qui contient du sérum après l'avoir dilué dans du PBS Ph= 7,2 :

_ ***Conjuguai fluorescent***

IgG

Humain ***Canin***



Dilution au 1/30éme Dilution au 1/100éme

_ Incubation à l'étuve à 37°C Pendant 30min
_ Rincer la lame au PBS à l'aide d'une pissette
_ tremper la lame dans un bac de lavage au PBS pendant 10min
_ Sécher la lame au Séchoir

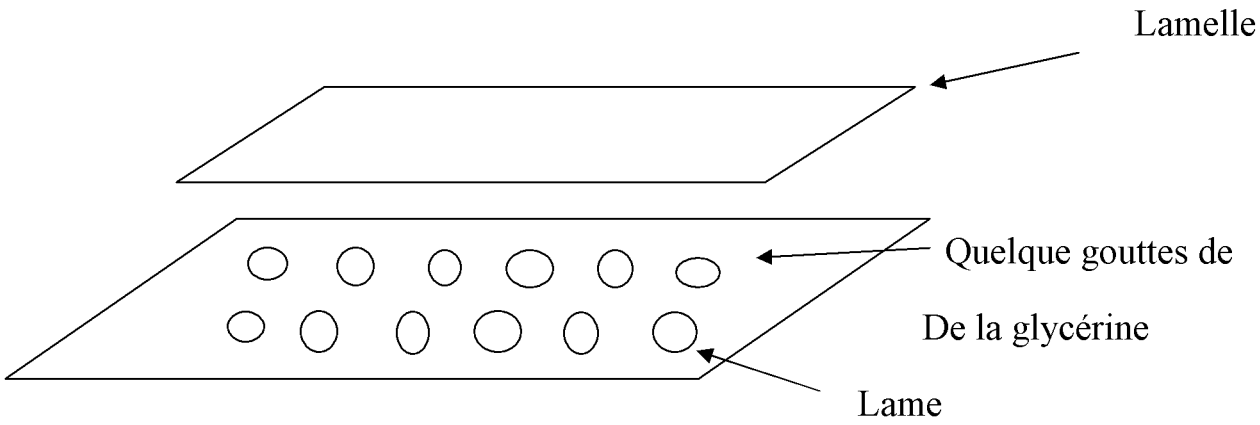
Etape 5 :

Déposer une goutte (10µl) du bleu d'EVANS dans chaque puits
_ Incubation à l'étuve à 37°C pendant 15min
_ Rincer la lame au PBS à l'aide d'une pissette
_ tremper la lame dans un bac de lavage au PBS pendant 10min

_ Sécher la lame au séchoir

Etape 6 :

Lecture de la lame au microscope à fluorescence (à UV), après l'avoir allumer à 15min d'avance :



Annexe 6

Tableau 3 : Résultat de LV par l'Immunofluorescence indirecte

Patients	Résultat d'IFI	Patients	Résultat d'IFI
Patient 1	(+1/20), (+1/40), (+1/80)	Patient 38	-
Patient 2	(+1/20), (+1/40), (+1/80)	Patient 39	(+1/20), (+1/40), (+1/80)
Patient 3	(+1/20), (+1/40), (-1/80)	Patient 40	-
Patient 4	-	Patient 41	-
Patient 5	-	Patient42	-
Patient 6	-	Patient 43	-
Patient 7	-	Patient 44	-
Patient 8	-	Patient 45	-
Patient 9	-	Patient 46	-
Patient 10	-	Patient 47	-
Patient 11	-	Patient 48	-
Patient 12	-	Patient49	-
Patient 13	(+1/20), (+1/40), (+/-1/80)	Patient 50	-
Patient 14	-	Patient 51	-
Patient 15	(+1/20), (+/1/40)	Patient 52	-
Patient 16	-	Patient 53	-
Patient 17	-	Patient 54	-
Patient 18	-	Patient 55	-
Patient 19	-	Patient 56	-
Patient 20	-	Patient 57	-
Patient 21	-	Patient 58	-
Patient 22	-	Patient 59	-
Patient 23	(+1/20), (+/1/40), (-1/80)	Patient 60	-
Patient 24	-	Patient 61	-
Patient 25	-	Patient 62	-
Patient 26	-	Patient 63	-
Patient 27	-	Patient 64	-
Patient 28	(+1/20), (+/1/40), (-1/80)	Patient 65	-
Patient 29	-	Patient 67	(+1/20), (+/1/40), (+1/80)
Patient 30	-	Patient 68	(+1/20), (+/1/40), (+1/80)
Patient 31	-	Patient 69	-
Patient 32	-	Patient 70	-
Patient 33	-	Patient 71	-
Patient 34	-	Patient 72	(+1/20), (+1/40)
Patient 35	-	Patient 73	-
Patient 36	-	Patient 74	(+1/20), (+1/40), (+1/80)
Patient 37	-		

Tableau 4 : Répartition des cas LV selon l'âge dans l'étude prospective

Age	Nombre de cas	Pourcentage
[0-5[	1	16,66%
[5-10[	0	0%
[10-15[	0	0%
[15-20[	1	16,66%
[20-25[	1	16,66%
[25-30[	0	0
> 30	3	50%
Totale	6	100%

Tableau 5 : Répartition des cas LV selon le sexe

Sexe	Effectif	Pourcentage
Féminin	1	16,66
Masculin	5	83,33
Total	6	100

Tableau 6 : Répartition des patients en fonction des régions

Région	Effectif	Pourcentage
Fréha	**2**	**33,33%**
Bouira	**1**	**16,66%**
Tizi-Ouzou	**1**	**16,66%**
Boughni	**1**	**16,66%**
Ouadia	**0**	**0**
Draa-El Mizane	**0**	**0**
Bejaia	**0**	**0**
Tademaït	**0**	**0**
Boumerdes	**0**	**0**
Azzefoun	**0**	**0**
Bouzgane	**0**	**0**
Maathka	**01**	**16,66%**
Totale	**06**	**100**

Tableau 7 : Répartition des cas LV par L'IFI selon la période d'étude

Mois	Janvier	Février	Mars	Avril	Mai
Nombre de cas	0	0	2	2	2

Annexe 7

Tableau 8 : Répartition des cas LV selon les années dans l'étude rétrospective entre 2007-2014

Année	L. Viscérale	
	Nbr de cas	pourcentage
2007	2	11,76%
2008	-	-
2009	9	64,28%
2010	9	40,90%
2011	-	-
2012	-	-
2013	-	-
2014	1	24,13%
Total	21	100%

Tableau 9 : Répartition des cas LV selon l'âge

Age	Nombre de cas	Pourcentage
[0,5[	5	23.80%
[5,10[	1	4.76%
[10,15[	0	0%
Adulte	15	71.43%
Totale	21	100%

Tableau 10 : Répartition des cas LV selon le sexe

Sexe	Nombre de cas	Pourcentage
Masculin	13	61.90%
Féminin	8	38.09%
Total	21	100%

Tableau 11 : Répartition des cas LV selon les régions entre 2007-2014

Entité	Région	Nombre de cas	Pourcentage
Massif Ancien	Meklaa	2	9.52%
	Larbaa Nath-Irathen	1	4.76%
	Béni douala	1	4.76%
	Ifigha	1	4.76%
	Bouzgane	1	4.76%
	Iletten	2	9.52%
	Maatka	1	4.76%
	Azazga	1	4.76%
	Béni zmenzer	1	4.76%
Valée de Sèbaou	Draa Ben Kheda	1	4.76%
	Tizi-Ouzou	3	14.29%
	Tirmithin	1	4.76%
Dépression Draa El Mizan	Draa El Mizan	1	4.76%
	Ait Bouadou	1	4.76%
	Bounouh	1	4.76%
	Amechras	1	4.76%
Littoral	Azzefoun	1	4.76%

Tableau 12 : Répartition des cas LV selon les régions entre 2007-2014

Région	Nombre de cas	Pourcentage
Massif Ancien	11	52.38
Valée de Sèbaou	5	23.81
Dépression Draa El Mizane	4	19.05
Littoral	1	4.76

Annexe 8: calculs statistiques

Test du X^2 pour la comparaison des pourcentages observés de deux séries indépendantes

Parmi les 74 prélèvements collectés au niveau de CHU on a effectué un diagnostique sérologique par l'Immunofluorescence indirect qui a révélé 6 cas positif issus des régions endémique, dont un est de sexe féminin (16,66%) et 5 de sexe masculin (83,33%).

Nous avons comparé les taux de séropositifs chez le sexe masculin et le sexe féminin par le test du X^2

En fait, le test du $\chi 2$
Permet d'analyser simultanément tous les échantillons et toutes les
Modalités : c'est une méthode générale d'analyse d'un tableau de contingence à k lignes et r colonnes. Il permet donc de comparer plusieurs distributions observées.

Problème posé
On a observé un pourcentage P_1 de patients séropositifs sur un échantillon de n1 du sexe masculin et un pourcentage P_2 de patients séropositifs sur un échantillon de n2 du sexe féminin.
On veut savoir si la prédominance est liée au sexe, ou si la différence observée entre P_1 et P_2 peut être attribuée aux fluctuations d'échantillonnage.
Soient P_1 et P_2 les pourcentages dans les populations dont sont issus les échantillons.

Hypothèses

Hypothèse nulle $\mathbf{H_0}$: $P1 = P_2$
Hypothèses alternative $\mathbf{H_1}$: $P1 \neq P_2$ bilatérale

Soit $P_1 < P_2$ Soit $P_1 > P_2$ unilatérale

Les pourcentages observés de patients guéris sont : $P_1 = \frac{O_{11}}{n_1}$ et $P_2 = \frac{O_{21}}{n_2}$

A partir des pourcentages observés p_1 et p_2 et des effectifs n_1 et n_2 de sujets traités et non Traités, il est possible de construire le tableau de contingence des effectifs observés :

	Echantillon 1	**Echantillon 2**	**total**
Séropositifs	O11	O21	m1
séronégatifs	O12	O22	m2
total	n1	n2	n

n_1, n_2, n_1, n_2 sont appelés effectifs marginaux.

La répartition théorique de la prédominance dans la population d'où sont issus les échantillons sous H_0 n'est pas connus.

Calcul des effectifs théoriques :

Sous l'hypothèse nulle:

• La meilleure estimation du pourcentage de prédominance sur l'ensemble de la population des sujets traités est $\mathbf{p} = \frac{m_1}{n}$ (on réunit les deux échantillons).

• Si les taux de prédominance est le mêmes dans les 2 populations définies, on peut calculer les effectifs théoriques dans les 2 échantillons et construire le tableau de contingence de ces effectifs théoriques :

	homme	**femme**	**Total**
Séropositifs	C11	C21	m1
Séronégatifs	C12	C22	m2
Total	n1	n2	n

$C_{11}=n_{1\times\frac{m_1}{n}}$

$C_{21}=n_{2\times\frac{m_1}{n}}$

$C_{12}=n_{1\times\frac{m_2}{n}}$

$C_{22}=n_{2\times\frac{m_2}{n}}$

En fait : Cij = (Total ligne i × Total colonne j) / Total général

La quantité $\sum_{i=1}^{i}\frac{(O_i-C_i)^2}{C_i}$ permet de mesurer la " distance " entre les deux tableaux et suit une loi du $\chi 2$ à 1 ddl (Connaissant les effectifs marginaux, il

Suffit en fait de calculer un seul des effectifs théoriques, pour déduire les trois autres).

Conditions de validité et réalisation du test :

Le test ne s'applique que si tous les effectifs calculés Cij ≥ 5.

On calcul : $\sum_{i=1}^{i} \frac{(O_{i-}c_i)^2}{C_i}$

Si la valeur du $\chi 2$ est supérieure à la valeur seuil correspondante au risque α choisi on rejette l'hypothèse nulle et on détermine le degré de signification.

Si la valeur du $\chi 2$ est supérieure à la valeur seuil correspondante au risque α choisi on rejette l'hypothèse nulle et on détermine le degré de signification.

Dans notre exemple :

Le tableau de contingence en effectifs Observés est :

	Echantillon 1	Echantillon2	total
Séropositifs	5	1	6
Séronégatif	42	26	68
total	47	27	74

Le tableau des effectifs théoriques est :

$$\mathbf{C_{11}} = \frac{6}{74} \times 47$$

$$\mathbf{C_{11}} = \frac{6}{74} \times 27$$

$$\mathbf{C_{12}} = \frac{68}{74} \times 47$$

$$\mathbf{C_{22}} = \frac{68}{74} \times 27$$

	Echantillon 1	Echantillon 2	Total
Positifs	3.81	2.18	6
Négatifs	43.19	24.81	68
Total	47	24.89	74

Les effectifs théoriques étant tous supérieurs ou égaux à 5, on calcule :

$$\mathbf{X^2} = \frac{(5-3.81)^2}{3.31} + \frac{(1-2.19)^2}{2.19} + \frac{(42-43.19)^2}{43.19} + \frac{(26-24.81)^2}{24.81} = 1.108$$

Nous avons comparé les taux de séropositifs chez le sexe masculin et le sexe féminin par le test du X^2, le calcule nous donne une valeur de $X^2=1,108$, inférieur à la valeur seuil de 3,84 au risque d'erreur égale à 0,05. On peut conclure qu'il n'y pas de différence significative entre séropositivité chez le sexe masculin et le sexe féminin.

Annexe 9 : Liste des tableaux

Tableau	Représentation	N° de page
Tableau 1	La répartition géographique de la leishmaniose dans le monde.	**5**
Tableau 2	Espèces et sous-espèces de *Leishmania* dans le monde. (ROBERTS & JANOVY, 2000).	**7**
Tableau 3	possibilité de diagnostique selon la forme de la leishmaniose (DEDET., 2009).	**17**

Annexe 10 : Liste des figures.

Figure	Répartition	N° de page
Figure 1	Répartition géographique des zones d'endémie de leishmanioses cutanées, cutanéo-muqueuse et viscérales (d'après E. Handman, 2001).	6
Figure 2	Nombreuse forme amastigotes dans un macrophage (MAZELET ,2004).	8
Figure 3	à gauche les Formes promastigotes de Leishmania et à droite Présence de nombreuses leishmanies, dans leur forme amastigote, en intra et extracellulaire (MGG×100). (OMS, 2004	9
Figure 4	Phlébotomes de *Lutzomyia* (à gauche) et *Phlebotomus* (à droite). (DEDET ,2001).	10
Figure 5	Cycle de la leishmaniose cutanée et viscérale (MALLORIE, 2011).	13
Figure 6	Aspect clinique d'enfant atteint d'une LV (TAMIMY, 2011).	15
Figure 7	leishmaniose cutanée localisée (DJEZZAR-MIHOUBI ILHEM, 2006).	16
Figure 8	leishmaniose cutanée diffuse (BACHI, 2006).	16
Figure 9	Répartition des zones d'endémies des leishmanioses viscérales dans la wilaya de Tizi-Ouzou	22
Figure 10	la gélose préparée de milieu NNN (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).	25
Figure 11	Les milieux gélosé au bain marie (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015)	26
Figure 12	La ponction cardiaque du lapin (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).	26
Figure 13	Recueil du sang de lapin dans l'erlenmeyer (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).	27
Figure 14	Inclinaison des tubes préparés (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).	27
Figure 15	Etuve pasteur à 37°C (Laboratoire parasitologie biomédicale 2015).	28
Figure 16	milieu NNN dans l'étuve à 37°C	28

Annexes

Figure 17	La gélose préparée de milieu CCS (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015).	**29**
Figure 18	Le milieu CCS (Laboratoire parasitologie biomédical, 2015)	**29**
Figure 19	prélèvement sanguin sur tube citraté après centrifugation.	**30**
Figure 20	incubation des lames sensibilisées dans l'étuve	**31**
Figure 21	incubation des lames après lavage dans le bac de PBS	**31**
Figure 22	Disposition des gouttes de bleu d'Evans dans chaque puits	**32**
Figure 23	Répartition des cas LV selon les années (Etude rétrospective)	**33**
Figure 24	Répartition des cas LV selon l'âge	**33**
Figure 25	Répartition des cas LV selon le sexe	**34**
Figure 26	Répartition des cas LV selon les régions	**34**
Figure 27	Répartition des cas LV selon l'âge (Etude prospective)	**35**
Figure 28	Répartition des cas selon le sexe	**35**
Figure 29	Répartition des cas LV selon les régions	**36**
Figure 30	Répartition des cas de LV selon la période d'étude	**36**

Résumé

Les leishmanioses sont un groupe de maladies dues au parasitisme des mammifères, dont l'homme, par des protozoaires flagellés du genre *Leishmania.* Largement répondus à la surface du globe, elles affectent 88 pays sur quatre continents. La maladie est transmise par la piqure d'un phlébotome du genre *Phlebotomus* ou *lutzomya*. Les manifestations peuvent être d'ordre viscéral, cutané ou cutanéomuqueuse, selon l'espèce de leishmania et l'immunité de l'hôte.

Notre travail est une étude prospective ayant concerné 74 sujets immunodépressifs colligés au centre hospitalo-universitaire(CHU) Nedir Mohamed de Tizi-Ouzou, durant une période d'étude de 3 mois allant du 1 mars 2015 au 3 juin 2015.l'âge des malades varie entre 5 ans jusqu'à l'âge adulte. La triade classique (fièvre-pâleur-splénomégalie) est présente chez tous les malades vu que ces derniers sont immunodéprimés. Le diagnostic sérologique par Immunofluorescence indirecte est effectué pour tous les malades durant la période d'étude, Les résultats obtenus ont révélé 6 cas positifs mettant en évidence la forme promastigote observée au microscope à UV par l'IFI.

Dans cette étude, nous proposons de mettre en relief l'intérêt de la technique IFI dans le diagnostic indirect de la LVH basée sur le dépistage des porteurs sains dans les prélèvements diagnostiqués. La gravité et l'impact social et économique de cette affection exigent un renforcement des mesures préventives et de sensibilisation de la population en milieu rural.

Abstract

Leishmaniasis is a group of diseases caused by parasites of mammals, including humans, by flagellate protozoa of the genus Leishmania. Widely answered the globe, they affect 88 countries on four continents. The disease is transmitted by the bite of a sandfly of the genus Phlebotomus or lutzomya. The events can be visceral order, cutaneous or mucocutaneous, depending on the species of Leishmania and the host immunity.

Our work is a prospective study involved 74 subjects collected immunosuppressed university hospital center (CHU) Nedir Mohamed Tizi-Ouzou, during a 3-month study period from March 1, 2015 to June 3 of 2015.Age of patients' ranges from 5 years to adult. The classic triad (fever, pallor, and splenomegaly) is present in all patients because they are immunocompromised. Serological diagnosis by indirect immunofluorescence was performed for all patients during the study period; the results obtained revealed six positive cases highlighting the promastigote form observed by UV microscope IFIs.

In this study, we propose to highlight the interest of the IFI technique in the indirect diagnosis of LVH based on screening for asymptomatic carriers diagnosed in samples. The seriousness and the social and economic impact of this disease require enhanced preventive measures and awareness of the rural population.